UNIVERSITATEA "AL.I.CUZA"IAŞI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ERICA NIMIŢAN
SIMONA DUNCA
OCTĂVIŢA AILIESEI
ŞTEFAN COMĂNESCU

METODE ŞI TEHNICI DE MICROBIOLOGIE

UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Elaborarea unui manual de lucrări practice de microbiologie generală reprezintă o muncă dificilă din mai multe motive. Mai întâi, este greu de selectat şi adunat, într-un spaţiu relativ restrâns, tehnici şi lucrări care să ilustreze toate capitolele microbiologiei generale, ştiinţă vastă şi complexă. În al doilea rând, deşi există numeroase manuale de tehnică microbiologică, acestea se referă doar la unele domenii specializate ale microbiologiei şi nu cuprind toate lucrările necesare pregătirii microbiologice a studenţilor biologi.

În manualul de faţă ne-am străduit să adunăm la un loc un număr de tehnici şi lucrări care pe de o parte să pună la îndemâna studenţilor elementele de bază în formarea lor complexă de biologi, iar pe de altă parte să completeze pregătirea lor în domeniul microbiologiei generale. Am căutat să prezentăm tehnici şi lucrări simple, mai uşor de executat în lipsa unei dotări foarte moderne, dar în acelaşi timp am avut permanent în vedere corelarea lor cu capitolele cursului. Toate lucrările pot fi executate cu şanse sigure de reuşită, ele fiind verificate şi experimentate mai mulţi ani la rând.

Sperăm că acest manual de lucrări practice să fie util studenţilor de la secţiile Biologie, Ecologie şi protecţia mediului şi Biochimie şi vom fi recunoscători celor care ne vor semnala lipsuri sau ne vor da sugestii de îmbunătăţire.

Autorii

BCU IASI

1. ORGANIZAREA ŞI DOTAREA LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE

1.1. AMENAJAREA LABORATORULUI

Organizarea şi dotarea unui laborator de microbiologie trebuie să satisfacă câteva cerinţe esenţiale care să asigure posibilităţi de lucru pentru efectuarea în bune condiţii a experienţelor şi să evite infectarea personalului.

Încăperile laboratorului vor avea lumină naturală sau artificială corespunzătoare, vor fi ferite de curenţi de aer care ar putea să vehiculeze microorganismele, vor fi situate în locuri lipsite de praf. Trebuie să aibă pardoselele netede (din mozaic sau parchet acoperit cu linoleum) pentru a putea fi uşor spălate şi dezinfectate. Pereţii trebuie să fie îmbrăcaţi cu faianţă sau vopsiţi în ulei. De asemenea, camerele trebuie să aibă reţea de gaz, apă şi canal, precum şi prize electrice

Pentru a asigura o bună funcţionalitate, laboratorul va cuprinde:

- un spaţiu pentru pregătirea materialelor (medii, tuburi, plăci, instrumentar, diverse recipiente de sticlă etc.);
- un spaţiu pentru sterilizarea mediilor de cultură, a tuburilor şi plăcilor Petri însămânţate şi incubate, a sticlăriei şi instrumentarului;
- o boxă cu lămpi de sterilizare,lipsită complet de posibilităţi de contaminare. În boxă se vor repartiza steril mediile de cultură, se vor efectua repicări pentru culturi pure sau pentru întreţinerea tulpinilor izolate sau orice alte lucrări care impun o deosebită atenţie pentru evitarea infectării sau contaminării.

BCU IASI - MEDICAL LIBRARY

Se va evita contactul materialelor sterile cu produsele sau materialele infectate.

Recipientele cu produse microbiologice se vor depune la laborator într-un spaţiu care să le protejeze de o suprainfectare externă.

În raport cu spaţiul şi funcţionalitatea, laboratorul va fi înzestrat cu următorul mobilier:

- mese de lucru din metal, acoperite cu plăci de faianţă sau plăci de sticlă;
- taburete metalice rotative;
- dulapuri de metal pentru reactivi;
- frigidere pentru conservarea mediilor de cultură, a suspensiilor bacteriene, a serurilor şi diferitelor tulpini microbiene izolate;
- găleţi de metal pentru colectarea materialului infectat (de preferat găleţi cu pedală);
- becuri Bunsen;
- stelaje pentru uscat sticlărie;
- stative din lemn pentru eprubete;
- stative pentru colorare.

1.2. DOTAREA LABORATORULUI ŞI PREGĂTIREA MATERIALELOR

Laboratorul de microbiologie trebuie utilat cu aparate, instrumente şi sticlărie dintre care unele sunt specifice iar altele sunt comune şi altor laboratoare (Fig. 1).

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

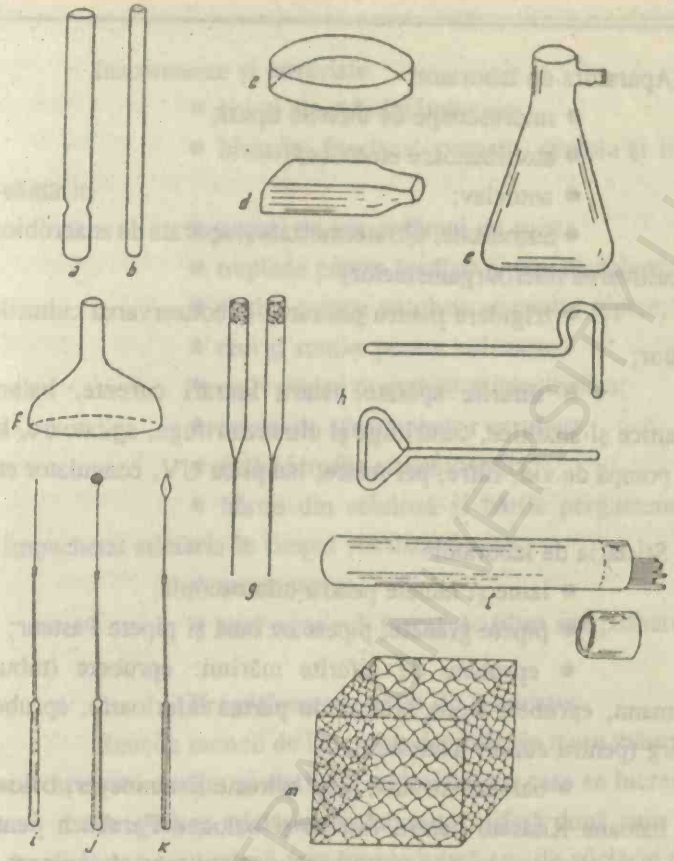


Fig. 1. Instrumente şi sticlărie de laborator: a. eprubetă Roux; b. eprubetă Weinberg; c. placă Petri; d. placă Roux; e. balon Kitasato; f. balon Fernbach; g. pipete Pasteur; h. baghete de sticlă pentru etalare; i., j. anse; k. ac spatulat; l. cilindru metalic pentru sterilizarea pipetelor; m. coş de sârmă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aparatura de laborator:

- microscoape de diferite tipuri;
- sterilizatoare electrice;
- autoclav;
- termostate, ultratermostate şi aparate de anaerobioză pentru cultivarea microorganismelor;
- frigidere pentru păstrarea şi conservarea culturilor şi mediilor;
- diferite aparate pentru lucrări curente, balanţe farmaceutice şi analitice, centrifuge şi ultracentrifuge, agitatoare, băi de apă, pompă de vid, filtre, pH-metre, lămpi cu UV, coagulator etc.

Sticlăria de laborator:

- lame şi lamele pentru microscopie;
- pipete gradate, pipete cu bulă şi pipete Pasteur;
- eprubete de diferite mărimi: eprubete (tuburi) Wassermann, eprubete Roux (gâtuite în partea inferioară), eprubete Weinberg (pentru culturi anerobe);
- baloane cu fund plat, baloane Erlenmeyer, baloane cotate, baloane Kitasato pentru filtrare şi baloane Fernbach pentru cultivarea microorganismelor ce necesită cantităţi mari de oxigen;
- cutii (plăci) Petri şi cutii (plăci) Roux;
- sticle şi borcane cu dop şlefuit, incolore şi colorate;
- cilindri gradaţi, cristalizatoare, baghete de sticlă, capsule de porţelan;
- pahare conice şi pahare Berzelius;
- exicatoare, pâlnii, tuburi de fermentaţie Durham

BCU IAŞI

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Instrumente şi materiale:

- ace şi anse de însămânţare;
- bisturie, foarfece, pensete, spatule şi linguriţe de cântărit;
- becuri de gaz şi lămpi cu spirt;
- trepiede pentru încălzit şi site de azbest;
- stative pentru eprubete şi pentru pipete;
- tăvi şi stative pentru colorare;
- cutii pentru preparate microscopice;
- coşuri de sârmă pentru eprubete;
- vată hidrofilă şi nehidrofilă;
- hârtie din celuloză şi hârtie pergamentată pentru împachetat sticlăria în timpul sterilizării;
- termometre;
- agar-agar sub formă de fibre sau pulbere.

Pregătirea sticlăriei de laborator

Reuşita muncii de laborator depinde, în mare măsură, de grija cu care este curăţat şi sterilizat materialul cu care se lucrează.

Pregătirea sticlăriei de laborator diferă după cum este vorba de sticlărie ce nu a mai fost întrebuinţată sau de sticlărie cu care s-a mai lucrat.

a) Spălarea sticlăriei care nu a mai fost întrebuinţată.

Sticlăria nouă se lasă câteva minute în amestec oxidant

sulfocromic[1] sau se fierbe într-o soluţie 1% de acid clorhidric. Se spală apoi bine la curent de apă.

Sticlăria care va servi pentru coloranţi sau reactivi se clăteşte şi cu apă distilată. Lamele de microscop se fierb timp de 30 minute în apă cu săpun sau în apă cu carbonat de sodiu 4%. Apoi se limpezesc şi se fierb 30 minute în amestec sulfocromic. Se limpezesc, se şterge fiecare lamă cu o cârpă uscată şi fără scame şi se păstrează împachetate în hârtie sau în cristalizoare cu alcool-eter (în părţi egale).

b) Spălarea şi pregătirea sticlăriei întrebuinţate.

1. Tuburi, baloane, pâlnii etc.

Sticlăria care a conţinut material infectant se pune în găleţi de zinc şi se sterilizează la autoclav, la 121°C, timp de 30 minute. Imediat după sterilizare, tuburile şi baloanele sunt golite de conţinutul lor şi spălate cu ajutorul periilor speciale. După limpezire şi uscare, tuburile şi baloanele se astupă cu dopuri simple de vată şi tifon. Dopul trebuie făcut în aşa fel, încât el să depăşească marginile recipientului cu o treime, pentru a putea fi uşor apucat. Dopul trebuie să-şi păstreze forma când este scos din tub şi să poată fi introdus cu uşurinţă la loc. Tuburile se împachetează separat. Baloanele, flacoanele Erlenmeyer şi altele se astupă mai întâi cu dopuri de vată, peste care se aşază o bucată de hârtie ce se leagă cu sfoară sub buza balonului.

2. Plăcilor Petri, după spălare şi uscare, li se

---

[1] Prepararea amestecului sulfocromic: se dizolvă prin încălzire 50 g bicromat de potasiu în 200 ml apă distilată. După răcire, se adaugă 800 ml apă şi apoi 500 ml acid sulfuric tehnic.

potrivesc cu grijă cele două capace şi se împachetează câte una sau în grupuri de 2-5.

3. Pipetele gradate se pun imediat după întrebuinţare - când s-a lucrat cu material infectant - în borcane sau pahare care conţin amestec sulfocromic (având grijă să se aspire amestecul până la dop) şi se lasă 24 ore. Pipetele care nu au fost folosite pentru material infectant se pun în pahare cu apă. După scoaterea lor din amestecul sulfocromic, pipetele se spală la curent de apă de robinet după care se clătesc bine cu apă distilată. După uscare în coşuri de sârmă, la capătul prin care se aspiră se pun dopuri de vată cu ajutorul unui fir subţire de sârmă. Dopul nu trebuie să fie nici prea strâns, ca să nu se poată aspira prin el, nici prea larg ca să se deplaseze în interiorul pipetei; de asemenea, dopul nu trebuie să depăşească marginile pipetei. Pipeta astfel pregătită se impachetează într-o fâşie de hârtie cu lăţimea de cca 3 cm (Fig. 2).

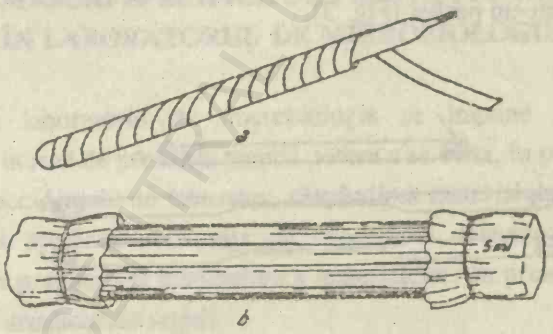


Fig. 2. Împachetarea pipetelor în vederea sterilizării: pipetă gradată; b. grup de pipete gradate.

Se îndoaie una din extremităţile hârtiei în aşa fel încât să se acopere vârful pipetei, apoi se imprimă hârtiei o mişcare în spirală, strângându-se bine pe suprafaţa sticlei. La nivelul capătului cu care se aspiră, hârtia se îndoaie şi se răsuceşte strâns.

Pipetele gradate mai pot fi ambalate pentru sterilizare după aplicarea dopului, direct în pachete; în acest caz este bine să se utilizeze toate pipetele la o lucrare căci păstrarea lor neînfăşurate în banda de hârtie, nu le garantează sterilitatea.

De asemenea, pipetele astupate cu dopuri de vată mai pot fi sterilizate într-un cilindru de metal cu capac, din care pot fi luate după necesităţi.

4. Pipetele Pasteur se confecţionează din tuburi de sticlă de 20-30 cm lungime, spălate şi uscate. Se şlefuiesc ambele capete şi se astupă cu dopuri de vată, după care se sterilizează (sterilizare uscată) împachetate în hârtie de ambalaj câte 50 până la 100 bucăţi într-un pachet (Fig. 3).

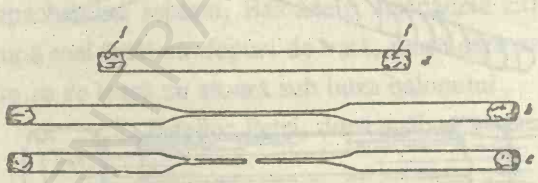


Fig. 3. Executarea pipetelor Pasteur: a. tub de sticlă cu dopuri de vată (sterilizat); b. tub de sticlă steril efilat la flacără; c. pipete Pasteur după secţionare şi închidere la flacără.

Pentru obţinerea pipetei Pasteur se ţine mijlocul tubului într-o flacără puternică a unui bec de gaz şi anume în porţiunea ei albastră. În timpul încălzirii tubul se răsuceşte mereu, menţinându-l continuu în flacără. Când sticla s-a înmuiat suficient pentru a fi trasă şi se îndoaie uşor, se scoate tubul din flacără şi în acelaşi timp se trage de cele două capete. În nici un caz nu se trag pipetele cât timp tubul este în flacără deoarece efilarea se face defectuos. După ce s-a obţinut o bună subţiere a sticlei şi o lungime corespunzătoare a pipetelor, se introduce în flacără numai partea subţire a tubului pentru tăierea pipetelor. Capetele tăiate se mai ţin câteva secunde în flacără pentru închidere prin sudare. O pipetă este bine executată când subţierea se face treptat spre vârf. Pipetele Pasteur astfel pregătite se păstrează în vase conice cu partea subţire în sus.

5. Mojarele şi pipetele se împachetează separat pentru sterilizare.

1.3. MĂSURI SPECIFICE DE PROTECŢIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

În laboratorul de microbiologie se impune respectarea anumitor norme de protecţia muncii pentru a se evita, în primul rând, infecţiile accidentale de laborator, răspândirea materialului infectant, precum şi accidentele cauzate de executarea defectuoasă a unor operaţii de pregătire şi manipulare a materialelor. În principiu, se au în vedere următoarele reguli:

♦ lucrările de laborator de efectuează numai de personalul instruit, echipat cu îmbrăcăminte de protecţie corespun-

zătoare ce se poate spăla şi dezinfecta (halat, şorţ, bonetă şi pentru anumite lucrări, mască, mănuşi de cauciuc);

♦ după executarea însămânţărilor este obligatorie sterilizarea imediată a pipetelor sau a anselor; ansele se sterilizează prin încălzire la roşu iar pipetele se introduc în recipientele cu soluţie dezinfectantă (amestec sulfocromic, bicromat de potasiu 5%, sublimat coroziv 0,1%);

♦ tuburile, plăcile Petri etc. cu culturi microbiene se adună în găleţi sanitare cu capac, se sterilizează prin autoclavare şi apoi se spală;

♦ în laborator trebuie să se găsească în permanenţă prosoape curate şi săpun, precum şi vase cu soluţii antiseptice (apă oxigenată, alcool 70%);

♦ este interzis să se mănânce sau să se fumeze în încăperile unde se lucrează cu material infectant. Persoanele trebuie să se spele pe mâini după executarea lucrărilor şi apoi să se dezinfecteze cu alcool iar când se impune o dezinfecţie mai severă, cu soluţie de biclorură de mercur 1‰ (sublimat coroziv).

În cazul când se produc contaminări accidentale în laborator se iau primele măsuri şi anume:

♦ dacă materialul infectant ajunge în gură, se elimină imediat, se clăteşte gura cu apă şi apoi se face gargară cu permanganat de potasiu 0,1%, apă oxigenată 1% sau soluţie de tinctură de iod (5 picături la un pahar de apă). Apoi se clăteşte cu apă, repetându-se de mai multe ori, timp de câteva ore. Dacă, accidental, materialul a fost înghiţit se clăteşte bine gura cu apă, apoi cu soluţie proaspătă de

permanganat de potasiu 0,1% şi se iau produse care conţin acid clorhidric n/10;

♦ în cazul când materialul infectant ajunge în ochi, se evită frecarea, se spală sacul conjunctival, de mai multe ori cu apă, apoi se fac instilări cu colire antiseptice sau unguente cu antibiotice;

♦ în cazul rănirilor produse de animale sau în urma manipulării neîndemânatice a unor instrumente, se lasă rana să sângereze bine, se badijonează cu tinctură de iod sau se aplică pulberi, unguente, soluţii de sulfamide sau antibiotice;

♦ în infecţii accidentale mai periculoase cu material ce conţine agenţii etiologici ai antraxului, tetanosului etc., rănile se cauterizează, cu precauţie, cu acid azotic fumans şi apoi se apelează imediat la medic.

În afara pericolului infectării, personalul din laboratorul de microbiologie trebuie bine instruit în privinţa utilizării aparaturii (autoclav, centrifugă, agitator) şi a substanţelor chimice. Pentru evitarea accidentelor, în dreptul aparatelor respective se vor afla afişate instrucţiuni de funcţionare şi manipulare.

2. STERILIZAREA

Prezenţa ubicuitară a microorganismelor în mediul extern, în cavităţile naturale, pe tegumentele şi mucoasele organismului uman şi animal impune anumite reguli pentru studierea lor.

Prima condiţie necesară pentru a putea studia un microorganism este izolarea lui în cultură pură, pe medii artificiale.

Toate operaţiile necesare studiului trebuie realizate în mod

aseptic iar însămânţarea produselor în vederea izolării microorganismelor se face pe medii sterile.

Prin sterilizare înţelegem distrugerea tuturor microorganismelor dintr-un mediu sau de pe un obiect, atât sub forma lor vegetativă cât şi sub formă de spori.

Distrugerea microorganismelor poate fi obţinută prin acţiunea agenţilor fizici sau chimici. La baza metodelor de sterilizare stă folosirea efectelor nocive ale acestor agenţi. În alegerea unei metode de sterilizare trebuie să ţinem seama de scopul urmărit şi de calităţile fizice şi chimice ale materialului supus sterilizării.

Sterilizarea poate fi realizată prin:

- **agenţi fizici** - căldura, filtrarea, energia radiantă, ultrasunetele;
- **agenţi chimici** - substanţe cu acţiune antimicrobiană.

2.1. STERILIZAREA PRIN AGENŢI FIZICI

Unul dintre agenţii fizici cu o largă utilizare în sterilizare este căldura, care realizează distrugerea formelor vegetative şi a sporilor prin degradarea proteinelor sau prin carbonizare. Pentru sterilizare se poate folosi atât căldura uscată cât şi căldura umedă.

2.1.1. Metode de sterilizare prin căldură uscată

Sterilizarea prin încălzire la roşu constă în încălzirea până la înroşire a obiectului de sterilizat în flacăra unui bec de gaz (Fig. 4).

BCU IAŞI - BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Procedeul este aplicabil numai la sterilizarea unor obiecte de metal: anse, spatule, ace de seringă etc.

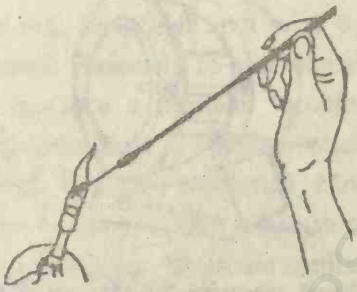


Fig. 4. Sterilizarea ansei în flacăra unui bec de gaz.

Înainte de a le pune în contact cu produsul de însămânţat, obiectele trebuie lăsate să se răcească pentru a nu omorî microorganismele prezente în produsul de însămânţat.

Sterilizarea prin flambare se efectuează trecând rapid şi în mod repetat obiectul de sterilizat printr-o flacără. Procedeul este aplicabil numai la obiecte de dimensiuni mici şi cu suprafaţă netedă, lipsite de asperităţi care ar putea proteja microorganismele (gâtul baloanelor şi eprubetelor, pipete, lame de sticlă etc.).

Sterilizarea la cuptorul cu aer cald (cuptorul Pasteur, sterilizatorul Poupinel). În prezent se utilizează sterilizatorul Poupinel (Fig. 5). Aparatul are formă cilindrică sau paralelipipedică şi este prevăzut cu pereţi dubli de tablă între care circulă aer cald.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

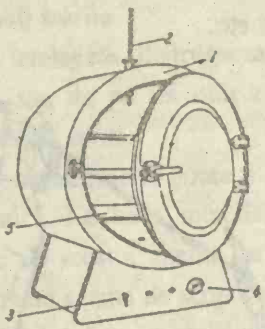


Fig. 5. Etuvă termoreglabilă pentru sterilizare: 1. pereţi dubli; 2. termometru; 3. buton de punere în funcţiune a sistemului electric de încălzire; 4. buton de reglare a temperaturii; 5. rafturi metalice.

În interior se găsesc rafturi de sită metalică pentru aşezarea obiectelor de sterilizat. La partea inferioară există o serie de rezistenţe electrice care constituie sursa de căldură iar în partea superioară un orificiu pentru termometrul ce indică temperatura din interiorul aparatului.

În cuptorul cu aer cald se sterilizează obiecte de sticlă, porţelan, hârtie, vată, instrumente metalice.

Pentru a se obţine o sterilizare perfectă este necesar să se menţină obiectele la temperatura de 180°C timp de 60 minute.

Obiectele curate, perfect uscate şi împachetate sunt aşezate pe rafturi, la distanţă de pereţi pentru a se evita carbonizarea hârtiei sau a dopurilor de vată. Se închide ermetic aparatul şi se conectează

rezistenţa la reţeaua de curent electric. Aparatele sunt prevăzute cu un sistem de reglare şi menţinere constantă a temperaturii. Se urmăresc indicaţiile termometrului de control şi după atingerea temperaturii de 180°C se menţine o oră: Se închide apoi sursa de căldură şi se lasă aparatul să se răcească. Obiectele se scot numai când temperatura interioară a ajuns egală cu a mediului înconjurător. Deschiderea aparatului înainte de răcire duce la spargerea sticlăriei prin diferenţa bruscă de temperatură. În timpul sterilizării, hârtia şi vata capătă o culoare uşor gălbuie. În cazul în care temperatura depăşeşte 180°C, hârtia sau vata se carbonizează. Obiectele sterilizate în acest fel nu trebuie să fie folosite. Hârtia şi vata se descompun sub acţiunea căldurii şi degajă un gudron bogat în substanţe antiseptice a căror prezenţă împiedică dezvoltarea microorganismelor ce dorim să le cultivăm. Dacă s-a produs carbonizarea, obiectele de sticlă trebuie spălate cu alcool, apoi cu apă, uscate şi sterilizate din nou.

Realizarea unei bune sterilizări la pupinel este indicată de îngălbenirea (nu carbonizarea) hârtiei sau a dopurilor.

Pentru controlul sterilizării se foloseşte testul caramelizării zaharozei la 170°C, conţinută în tubuşoare de sticlă ce se aşază la diferite nivele în interiorul sterilizatorului.

2.1.2. Metode de sterilizare prin căldură umedă

Căldura umedă permite o sterilizare eficace la o temperatură mult mai joasă decât cea necesară în cazul sterilizării cu aer cald, deoarece are o mare putere de penetraţie, distrugând microorganismele într-un timp mai scurt.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sterilizarea prin fierbere este procedeul folosit curent pentru sterilizarea instrumentelor metalice, seringilor etc. Obiectele se introduc în sterilizatoare electrice, în apă distilată pentru a nu se depune săruri în timpul fierberii şi sunt menţinute timp de 30 minute. Fierberea nu este o metodă de sterilizare completă, deoarece temperatura de 100°C sub formă de căldură umedă distruge doar formele vegetative, în timp ce unii spori rezistă. De aceea fierberea se foloseşte atunci când nu se cer condiţii riguroase de sterilizare iar obiectele trebuie întrebuinţate imediat.

Pentru a împiedica ruginirea instrumentelor şi totodată pentru a ridica punctul de fierbere al apei, se poate adăuga în apă borax sau carbonat de sodiu (Na_2CO_3) 4-5%.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea) se foloseşte pentru medii de cultură, materiale infectate, seringi de sticlă, obiecte de cauciuc, aparate de filtrat etc.

Acest mod de sterilizare se realizează cu ajutorul autoclavului (Fig. 6) care este format dintr-un recipient metalic cu pereţi dubli, prevăzut cu un capac greu care se adaptează prin intermediul unor buloane. Etanşeitatea este asigurată de o garnitură de azbest sau cauciuc. Aparatul este prevăzut cu o supapă de siguranţă, un robinet de vapori şi un manometru care indică presiunea în atmosfere şi prin echivalenţă temperatura din interiorul cazanului (la 0,5 atm. corespunde 115°C, la 1 atm. 121°C şi la 2 atm. 134°C). În interior se găseşte un trepied înalt de câţiva centimetri pe care se pune un coş sau o găleată în care se aşază obiectele de sterilizat. Sub aparat se găseşte sursa de căldură care poate fi constituită dintr-o dublă rondelă de

becuri de gaz. Aparatul în întregime, inclusiv sursa de căldură, este îmbrăcat la exterior într-un alt înveliş metalic, iar pe partea laterală este prevăzut cu un tub de nivel pentru controlul cantităţii de apă din interior, o pâlnie de umplere a cazanului precum şi un robinet de golire.

Pentru punerea în funcţie a autoclavului se introduce în aparat apă distilată până la nivelul indicat pe sticla de nivel. Coşul sau găleata cu obiecte de sterilizat, acoperit cu hârtie pentru a evita umezirea lor prin apa de condesare a vaporilor de pe capac, se aşază pe trepied. Se închide capacul cu ajutorul buloanelor prin strângerea a câte două diametral opuse: strângerea se face în două reprize. Se deschide robinetul de vapori şi se aprinde arzătorul cu gaz. Când apa începe să fiarbă, vaporii vor ieşi prin robinet, mai întâi într-un jet întrerupt, apoi continuu, şuierând. Este necesar să se scoată tot aerul din aparat, deoarece prezenţa lui falsifică indicaţiile manometrului. Se închide apoi robinetul de vapori şi din acest moment acul manometrului începe să indice creşterea presiunii. Când s-a realizat presiunea dorită, se reglează flacăra astfel încât temperatura în aparat să rămână constantă cât timp este necesar. Datorită puterii mari de penetraţie a vaporilor, sunt suficiente 20-30 minute de sterilizare.

Gradul de temperatură variază după calitatea materialului de sterilizat. Pentru materialele obişnuite se obţine o sterilizare completă (distrugerea formelor vegetative şi a sporilor) la 115-121°C, timp de 20-30 minute.

După trecerea timpului necesar pentru sterilizare, se stinge sursa de căldură. Când acul manometrului a coborât la zero, se deschide robinetul de vapori iar după evacuarea lor completă, se

deschide capacul şi se scot obiectele. Deschiderea aparatului înainte de scăderea completă a presiunii produce decompresiunea bruscă şi proiectarea lichidelor din flacoane.

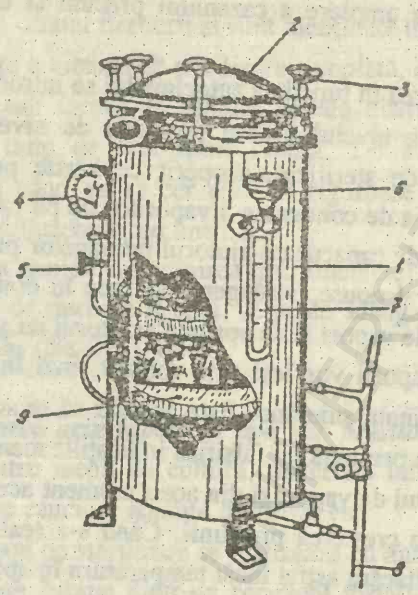


Fig. 6. Autoclav: 1. pereţii autoclavului; 2. capacul autoclavului; 3. şuruburi care închid ermetic capacul; 4. manometru de presiune; 5. robinet pentru evacuarea vaporilor; 6. pâlnie pentru introducerea apei între pereţii cazanului; 7. tub de nivel al apei; 8. racord la conducta de gaze; 9. trepied pe care se aşază materialele de sterilizat.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deşi sterilizarea mediilor de cultură cu ajutorul vaporilor este aparent simplă, ea prezintă următoarele inconveniente:

a) determină o denaturare a proteinelor şi inactivarea unor enzime;

b) produce distrugerea unor vitamine şi factori de creştere;

c) supraîncălzirea poate antrena polimerizarea unor compuşi şi brunificarea mediului. Aceste fenomene se datoresc:

- ♦ caramelizării zaharurilor;
- ♦ oxidării fenolilor şi a acidului ascorbic;
- ♦ polimerizării aldehidelor nesaturate;
- ♦ reacţiilor chimice dintre grupările aldehidice ale glucidelor reducătoare cu grupările aminice ale aminoacizilor, polipeptidelor şi proteinelor (reacţia Maillard). Produşii rezultaţi din reacţia Maillard sunt toxici pentru numeroase microorganisme.

De aceea, în cazul mediilor complexe este necesară sterilizarea separată a glucidelor şi a substanţelor azotate şi apoi amestecarea lor sterilă în proporţiile cerute de reţetă în momentul utilizării. Sterilizarea acestora se face la autoclav (115°C, 20 minute) sau fracţionat.

S-au construit autoclave care au cazanul de presiune în poziţie orizontală (autoclav orizontal). Vaporii provin dintr-o sursă separată şi apoi sunt admişi în cazan. Aerul este îndepărtat printr-o pompă de vid, ceea ce asigură penetraţia rapidă şi perfectă a vaporilor în porozităţile ambalajelor şi materialelor. După sterilizare vaporii sunt îndepărtaţi rapid şi vidul creat astfel asigură uscarea perfectă a materialelor sterilizate.

Autoclavele orizontale cu prevacuum sunt indicate pentru

sterilizarea materialelor chirurgicale şi permit uscarea perfectă şi rapidă a obiectelor. Absenţa aerului în timpul încălzirii elimină riscul degradării materialelor sub acţiunea oxigenului în condiţiile căldurii umede. La aceste aparate nu se sterilizează soluţii.

Funcţionarea în bune condiţii a autoclavului şi realizarea unei bune sterilizări pot fi controlate prin mai multe procedee: chimice, fizice şi biologice.

Testele chimice constau în utilizarea unor substanţe cu punct de topire cunoscut: benzonaftolul - 110°C, antipiridina - 114°C, floarea de sulf - 114°C, rezorcina - 119°C, acidul benzoic - 121°C. Asemenea substanţe se introduc în tubuşoare de sticlă, închise la extremităţi ce se aşază printre obiectele de sterilizat. Pentru a face vizibilă topirea substanţei, se încorporează urme de coloranţi (albastru de metilen, fucsină, violet de genţiană). Testele chimice ne ajută să verificăm dacă s-a realizat temperatura de sterilizare în interiorul autoclavului, dar au dezavantajul ca nu indică şi timpul de acţiune a temperaturii. În practica sterilizării se foloseşte floarea de sulf şi fucsină.

Testele fizice folosesc termometre cu mercur de 200°C aşezate cu rezervorul în interiorul aparatului şi cu tubul gradat la exterior pentru a se putea citi temperatura.

Testele biologice constau în folosirea unor culturi sporulate care rezistă la temperaturi ridicate (*Bacillus anthracis* ai cărui spori sunt distruşi la 115°C sau *Clostridium botulinum* la 125°C). Sterilizarea este eficientă dacă însămânţarea sporilor după autoclavare nu este urmată de dezvoltarea bacteriilor. În practică se întrebuinţează fire usacte de bumbac sau mătase, îmbibate în prealabil în cultura

sporulată şi închise într-un tub de sticlă steril. După sterilizare se sparge tubul şi firele se însămânţează într-un mediu de cultură. Dacă după 48 ore mediul rămâne steril, sterilizarea a fost realizată în bune condiţii. Testele biologice sunt cele mai eficiente pentru că indică atât nivelul temperaturii cât şi timpul de acţiune asupra microorganismului testat.

Pasteurizarea, procedeu descris de Pasteur, este o metodă de sterilizare incompletă, aplicabilă substanţelor lichide prin care se realizează doar distrugerea formelor vegetative, nu şi a sporilor. Pasteurizarea se poate face la temperatura de 60-65°C, timp de 30 minute. Aceasta este o pasteurizare joasă. Când temperatura folosită este de 70-75°C, timp de 10-20 minute se realizează o pasteurizare medie. Când lichidele supuse pasteurizării sunt aduse într-un strat subţire în contact cu suprafeţe încălzite de 85-90°C, timp de câteva secunde, urmată de o răcire bruscă la 4°C, se realizează o pasteurizare înaltă. Pasteurizarea şi mai ales pasteurizarea înaltă se foloseşte curent în industria laptelui. Ea are drept scop distrugerea microbilor patogeni din lapte, fără a altera vitaminele şi valoarea alimentară.

Tindalizarea (sterilizarea fracţionată), metodă de sterilizare descrisă de TYNDALL, este o pasteurizare repetată care se utilizează în cazul când substanţele de sterilizat au un grad mare de termolabilitate distrugându-se printr-o încălzire la 121°C. Asemenea materiale sunt reprezentate de mediile de cultură cu hidraţi de carbon sau cu substanţe proteice macromoleculare (mediile cu ou, serul

coagulat). Astfel mediile cu zaharuri se tindalizează la 100°C, serul coagulat sau mediile cu ou la 70-80°C. Când materialele suportă temperatura de 100°C, tindalizarea se execută, de regulă, în autoclav. Pentru aceasta capacul nu se strânge cu buloane, iar robinetul rămâne tot timpul deschis. Materialele se sterilizează în vapori de apă la presiune normală. În cazul când temperatura de 100°C nu este suportată de materialele respective, tindalizarea va fi făcută la temperatura corespunzătoare în băi de apă sau, în cazul mediilor de cultură care necesită şi un proces de coagulare, în aparate speciale - coagulatoare.

Sterilizarea fracţionată constă în încălzirea la temperatura respectivă a materialelor de sterilizat timp de 30-60 minute, de trei ori consecutiv, la interval de 24 ore. Prin încălzirea în ziua întâia se distrug formele vegetative ale bacteriilor, sporii rămânând viabili. După 24 ore de păstrare a mediilor la temperatura camerei, având condiţii favorabile, sporii vor germina. În urma germinării sporilor rezultă celule vegetative care vor fi distruse de încălzirea din ziua a doua. Tratamentul termic din ziua a treia se face cu scopul de a distruge şi eventualele celule vegetative rezultate din germinarea tardivă a unor spori. Acesta este, de fapt, o probă de control.

2.1.3. Filtrarea

Pentru sterilizarea substanţelor ce se modifică sub acţiunea căldurii (toxine bacteriene, lichide biologice, unele medii de cultură) se foloseşte filtrarea, metodă mecanică de sterilizare care constă în

trecerea unui lichid printr-o substanţă poroasă care reţine microorganismele. Filtrarea nu este o metodă de sterilizare perfectă, deoarece virusurile şi chiar unele bacterii pot traversa pereţii filtrelor.

Mecanismul intim al filtrării este reprezentat de un întreg complex de fenomene fizico-chimice (capilaritate, tensiune superficială şi adeziune moleculară, diferenţe de sarcini electrice, vâscozitate etc.) şi nu se datoreşte unei acţiuni pur mecanice, de reţinere a bacteriilor în raport numai cu dimensiunile porilor materialului filtrant. De asemenea, natura lichidului de filtrat, temperatura şi pH-ul acestuia influenţează adeziunea lui la peretele porilor.

În lucrările de microbiologie se folosesc diferite tipuri de filtre deosebite prin materialul din care sunt confecţionate. Pentru fiecare tip se folosesc diferite notări care indică dimensiunile porilor.

1. Filtrele Chamberland, din porţelan poros, se notează cu litera L urmată de o cifră (L_1 - L_7), cel mai grosier fiind L_1. Filtrele L_3 opresc bacteriile şi sporii lor (Fig.7).

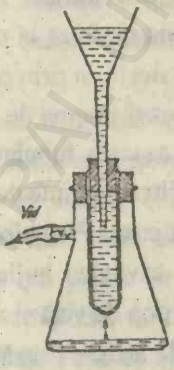


Fig. 7. Filtru de tip Chamberland montat la balon Kitasato.

2. **Filtrele Berkefeld** din pământ de infuzorii, se notează cu literele V (viel), N (normal) şi W (wenig), în ordinea descreşterii porilor.

3. **Plăcile filtrante de azbest** pentru filtrele Saitz se notează cu EK, EK_1 şi EK_2. Filtrele EK_1 reţin bacteriile iar filtrele EK_2 reţin şi virusurile mari.

4. **Filtrele de sticlă**, notate cu litera G, sunt de cinci dimensiuni (G_1 - G_5); filtrele G_5 reţin bacteriile.

5. **Membranele filtrante** se pot confecţiona din diverse materiale cum sunt colodiul, celuloza, gelatina iar în ultimul timp din diferite mase plastice. Membranele filtrante se folosesc în special în virusologie şi în toate împrejurările în care sunt necesari pori foarte mici (5-3000 milimicroni).

Filtrele Chamberland precum şi cele Berkefeld au forma unor lumânări (bujii), închise la o extremitate. Filtrul se montează prin intermediul unui dop de cauciuc perforat la un balon Kitasato.

Trecerea lichidelor de sterilizat prin porii filtrului se face, prin aspiraţie realizată cu ajutorul unei pompe de vid la care se adaptează prin intermediul unui tub de cauciuc tubulatura laterală a balonului Kitasato prevăzut cu bujia de filtrat. Înainte de filtrare, bujia şi balonul Kitasato trebuie spălate şi sterilizate. Pregătirea filtrului se face astfel: se adaptează bujia la balon, cavitatea bujiei ca şi tubul lateral al balonului sunt acoperite cu un dop de vată şi apoi cu capişon de hârtie legat cu sfoară. Ansamblul astfel pregătit este sterilizat prin autoclavare, la 115°C, timp de 30 minute.

În momentul întrebuinţării, după îndepărtarea învelişului de

hârtie, balonul de adaptează la pompa de vid, după care se umectează bujia cu ser fiziologic sau cu apă distilată, apoi se introduce lichidul de sterilizat. Se realizează vidul dorit, lichidul străbate porii şi curge steril în balon. După filtrare, se opreşte dispozitivul de vid, se aşteaptă puţin, pentru egalizarea presiunii, se îndepărtează tubul de cauciuc, după care lichidul steril se decantează la flacără. După întrebuinţare bujiile sunt sterilizate prin autoclavare la 121°C, 20-30 minute apoi sunt spălate cu peria la curent de apă şi clătite cu apă distilată. Din timp în timp, bujiile trebuie verificate pentru controlul permeabilităţii porilor. După folosire îndelungată, porii bujiei se obturează şi ele trebuie regenerate prin autoclavare cu decompresiuni bruşte, prin calcinare sau alte procedee.

Sistemul de filtrare cu filtre Seitz (fig. 8) este cel mai frecvent folosit în practica de laborator. Întrebuinţarea plăcilor filtrante Seitz se face prin aşezarea lor în armătura metalică şi montarea prin intermediul unui dop de cauciuc la un balon Kitasato. Înainte de filtrare, filtrul montat la balon trebuie bine spălat şi sterilizat la autoclav.

Aparatul de filtrare Seitz este de două tipuri:

a) pentru filtrarea prin aspiraţie, aparatul se compune dintr-o pâlnie metalică de formă cilindrică prevăzută la partea inferioară cu o rondelă de sită peste care se aşază placa de azbest. Aceasta se fixează etanş pe pâlnie prin 3-6 şuruburi laterale. În interiorul pâlniei se toarnă lichidul de filtrat iar prin tubul lateral al balonului Kitasato se face aspiraţia cu ajutorul unei pompe de vid.

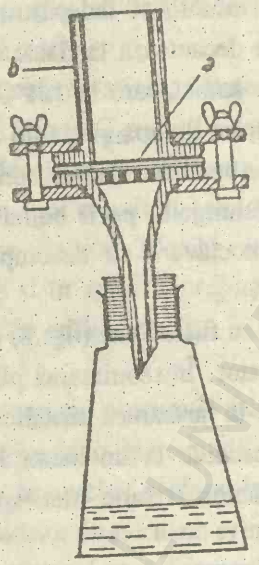


Fig. 8. Filtru de tip Seitz: a. placă filtrantă; b. corpul filtrului.

b) pentru filtrarea cu presiune pozitivă sau compresiune, partea superioară a pâlniei cilindrice este complet închisă cu un capac metalic etanş prevăzut cu două robinete. Prin unul din robinete se toarnă în pâlnie o parte din lichidul de filtrat şi apoi de închide

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

robinetul. Se deschide al doilea robinet şi se adaptează o pompă de presiune pozitivă. Este preferabil să se folosească o pompă de azot care prin intermediul unui dispozitiv reductor să realizeze 0,3 atm sau maximum 0,5 atm în filtru.

La unele tipuri placa de azbest se întrebuinţează numai la o singură filtrare.

2.1.4. Sterilizarea cu raze ultraviolete

Radiaţiile cu lungimi de undă între 2540 - 2800 Å au efectul bactericid cel mai puternic. Razele ultraviolete sunt nocive pentru formele vegetative ale bacteriilor, având o acţiune mai redusă asupra sporilor. Ca surse artificiale de ultraviolete se folosesc lămpile cu vapori de mercur. Razele ultraviolete sterilizează numai corpuri transparente şi au o putere redusă de penetraţie. Se folosesc în special pentru sterilizarea încăperilor şi a boxelor pentru lucru steril.

2.1.5. Sterilizarea cu ultrasunete

Ultrasunetele sunt vibraţii acustice a căror frecvenţă depăşeşte cu mult limitele percepţiei acustice umane. Acest gen de vibraţii se obţin în aparate speciale care permit trecerea unui curent alternativ de înaltă frecvenţă printr-un cristal de cuarţ. Vibraţiile cristalului sub acţiunea impulsurilor electrice au o intensitate de peste 20 KHz pe secundă, ceea ce duce la dezintegrarea rapidă a celulelor bacteriene.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. STERILIZAREA PRIN AGENŢI CHIMICI

Unele substanţe chimice cu acţiune antimicrobiană sunt utilizate fie pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor într-un mediu de cultură sau într-un lichid biologic, fie pentru distrugerea completă a tuturor bacteriilor.

În primul caz se vorbeşte de acţiune bacteriostatică sau antiseptică, în cel de-al doilea caz de acţiune bactericidă sau dezinfectantă.

Substanţele chimice antimicrobiene mai posedă o proprietate importantă - acţiunea selectivă. Aceeaşi substanţă poate avea efect bactericid asupra unei specii, bacteriostatic faţă de altă specie sau indiferent faţă de o a treia specie microbiană.

Adeseori, între acţiunea antiseptică şi cea dezinfectantă există deosebiri numai în ceea ce priveşte concentraţia. De exemplu, fenolul în concentraţie de 2-5% este dezinfectant iar în concentraţie de 0,02 - 0,05% este antiseptic (tabelul 1).

Tabelul 1

Principalii agenţi chimici de sterilizare şi domeniul lor de utilizare

Denumirea substanţei	Forma de utilizare	Domeniul de utilizare
Acid boric	soluţie 3-4%	antiseptic al mucoaselor
Acid sulfuric	soluţie 5%	dezinfecţia duşumelelor

Denumirea substanţei	Forma de utilizare	Domeniul de utilizare
Hidroxid de sodiu	soluţie 1-3%	dezinfecţia mobilierului
Alcool etilic	soluţie 70%	antiseptic al tegumentelor
Săruri ale metalelor grele		
Biclorura de mercur	soluţie 1‰	dezinfecţia suprafeţelor şi a mâinilor
Oxiclorura de mercur	soluţie 1/6000	dezinfecţia instrumentarului
Azotatul de argint	soluţie 1%	antiseptic pt. instilaţii conjunctivale
Substanţe oxidante		
Clor gazos	2-3 mg/l	potabilitatea apei
Hipoclorit de Na	0,5% clor activ	antiseptic al plăgilor
Hipoclorit de Na	25% clor activ	dezinfectant
Hipoclorit de K	25% clor activ	dezinfectant
Cloramina (25% clor activ)	suspensie 10-20%	dezinfectant
Iodul	soluţie alcoolică 1-5%	antiseptic al tegumentelor

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Denumirea substanţei	Forma de utilizare	Domeniul de utilizare
Apă oxigenată	soluţie 3%	antiseptic al plăgilor
Permanganat de K	soluţie 0,1%	dezinfecţia instrumentarului
Permanganat de K	soluţie 0,01%	antiseptic (gargarisme)
Aldehidă formică	vapori	sterilizarea încăperilor, îmbrăcăminte
Aldehidă formică	soluţie 5% în apă	dezinfecţia instrumentelor şi suprafeţelor
Fenolul	soluţie 3-5%	dezinfectant al suprafeţelor
Crezoli (metilfenoli)	emulsie 5% în apă fierbinte	dezinfecţie
Creolina (crezoli activaţi cu săpun de gudron)	emulsie 5-10% în apă	dezinfecţie
Hexaclorofen	soluţie 1% în săpun	antiseptic al tegumentelor
Detergenţi cationici (săruri de amoniu cuaternar)	soluţie 0,1%	antiseptic al tegumentelor şi plăgilor

BCU IASI CENTRAL LIBRARY

Denumirea substanţei	Forma de utilizare	Domeniul de utilizare
Detergenţi anionici (alchilarilbenzensulfonaţi)	soluţii	agenţi de spălare mecanică
Săpunuri de Na şi K	soluţii	agenţi de spălare mecanică

3. MEDIILE DE CULTURĂ

3.1. DEFINIŢIE, CONDIŢII, CLASIFICARE

Microorganismele se pot dezvolta şi în afara mediului lor natural pe medii de cultură artificiale, care reprezintă substraturi nutritive (lichide sau solide, organice sau anorganice) ce pot asigura dezvoltarea şi multiplicarea lor. Mediile se folosesc pentru izolarea şi păstrarea sub formă de culturi pure a microorganismelor, precum şi pentru identificarea speciilor în funcţie de proprietăţile lor fiziologice. De aceea ele trebuie să fie cât mai asemănătoare cu substraturile naturale.

Mediile de cultură trebuie să îndeplinească anumite condiţii pentru ca specia microbiană să se poată dezvolta:

- mediul trebuie să conţină substanţele necesare microorganismului precum şi ingredientele care condiţionează

creşterea sa;

♦ substanţele trebuie să corespundă indicaţiilor tehnice (cristalizate sau nu, anhidre sau cu un anumit număr de molecule de apă, preparate de anumite firme etc.), să fie cântărite exact şi să fie introduse în recipient în ordinea strict indicată;

♦ să aibă gradul de alcalinitate sau aciditate (pH) corespunzător dezvoltării microorganismului respectiv şi să-i asigure menţinerea în limite compatibile cu creşterea lui (prin sisteme tampon);

♦ mediul trebuie să fie stabil adică să-şi păstreze toate calităţile iniţiale pe toată durata incubării;

♦ sterilizarea nu trebuie să altereze mediul şi el trebuie să rămână steril până în momentul însămânţării lui;

♦ mediul trebuie să asigure condiţiile de aerobioză sau anaerobioză corespunzătoare microorganismului respectiv;

♦ să fie repartizate în recipiente care să împiedice contaminarea culturii care se dezvoltă în ele, atât înainte cât şi după însămânţare;

♦ să asigure un anumit grad de umiditate şi adăpost de lumină.

3.2. CLASIFICAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Diversitatea extremă a compoziţiei chimice a mediilor nutritive nu permite o clasificare propriu-zisă, deoarece suprapunerile apar foarte frecvent. Criteriile de clasificare sunt următoarele:

BCU IAŞI CENTRUL VECHI LIBRARY

A. După proveniență:

1. Medii naturale:

- Lichide: mustul de malț (pentru levuri), lapte, bilă etc.;
- Solide: cartof glicerinat (pentru *Mycobacterium tuberculosis*);

2. Medii artificiale:

- Simple:
  - Lichide: bulionul, apa peptonată;
  - Solide: geloză, gelatina;
- Complexe:
  - Lichide: bulion-sânge, bulion-ser;
  - Solide; geloză-sânge, geloză-ser;.

Mediile complexe conțin ingrediente cu compoziție chimică nedefinită. Extractele organice (din levuri, din țesuturi vegetale sau animale) suplimentează mediile complexe cu ioni anorganici, aminoacizi, peptide, purine, pirimidine, vitamine, carbohidrați etc. Aceste medii constituie suportul de creștere pentru microorganismele cu necesități nutritive complexe.

3. Medii sintetice: sunt acele medii care au o compoziție chimic definită (soluții minerale, zaharuri simple, aminoacizi);

B. După compoziție:

1. Medii albuminoase (Dorset);

2. Medii zaharoase (Drigalski);

C. După scopul utilizării:

1. Medii uzuale simple: folosite în mod curent în laborator, pentru cultivarea unui număr mare de microorganisme (bulionul, apa peptonată, geloza, gelatina);

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. *Medii speciale*: folosite în scopuri bine precizate, sunt tot medii complexe, dar prin compoziţia lor permit creşterea preferenţială a anumitor specii dintr-un amestec heterogen de microorganisme dintr-o probă naturală sau evidenţierea anumitor caractere particulare de metabolism ale microorganismului cultivat, aceste medii conţin:

- un indicator de pH;
- un zahar fermentescibil;
- antiseptice selective;
- antibiotice.

Mediile speciale au o compoziţie alcătuită astfel încât să permită creşterea preferenţială a unor specii microbiene, să pună în evidenţă anumite caracteristici metabolice sau folosite în alte scopuri precise. Acestea, la rândul lor, pot fi împărţite în mai multe grupe:

- **medii de îmbogăţire**, capabile să favorizeze dezvoltarea anumitor specii microbiene aflate în concentraţii mici în produse cu floră asociată (ex. mediile Müller - Kauffman, Leifson, Champman solid etc.);

- **medii selective** - sunt medii ce conţin substanţe bacteriostatice care inhibă creşterea unor specii saprofite sau patogene şi substanţe ce favorizează dezvoltarea anumitor specii (ex. mediile Istrate-Moitert, Wilson-Blair, Christensen, Loewestein, Jennon, Levine, Endo, bulion-bilă cu lactoză şi verde brillant);

- **medii elective** - sunt medii fără substanţe bacteriostatice, a căror compoziţie oferă condiţii de dezvoltare unor specii care cresc mai rapid decât flora de asociaţie (ex. mediile Lõeffler, Bordet-Gengou);

BCU IASI

- **medii diferenţiale (de identificare)** - sunt medii ce conţin indicatori pentru punerea în evidenţă a unor procese biochimice caracteristice pentru metabolismul unor specii (fermentarea zaharurilor, capacitatea de oxido-reducere, utilizarea acidului citric ca unică sursă de carbon etc.) ex. mediile Fergussen, Clark-Lubs, Hins, Drigalski, Konser, bulion cu roşu neutru;

- **medii de conservare** - sunt medii folosite pentru menţinerea în viaţă a unei culturi (ex. mediile Dorset, agar moale).

3.3. PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

3.3.1. Prepararea mediilor simple

Pentru numeroase medii de cultură, substanţa nutritivă de bază o constituie maceratul de carne. Unele laboratoare au posibilitatea de a obţine produse standard (extracte de carne produse de firmele Merck sau Difco), care permit prepararea rapidă şi simplă a mediilor. Până la extinderea acestei posibilităţi în toate laboratoarele trebuie cunoscute şi tehnicile clasice care utilizează maceratul de carne pentru prepararea bulionului nutritiv şi a gelozei.

Bulionul de carne

Bulionul de carne reprezintă mediul de bază în microbiologie. Prepararea lui se realizează în două etape: prepararea maceratului şi apoi a bulionului propriu-zis.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Maceratul. Carnea slabă de vită sau cal, în cantitate de 500 g, se curăţă de oase, tendoane, aponevroze şi grăsime, se toacă şi se macerează la rece în 1000 ml apă de robinet, timp de 12-24 ore. În acest interval de timp se realizează autoliza ţesuturilor şi solubilizarea produselor de autoliză în apă. Se fierbe apoi maceratul timp de 10 minute pentru a accentua dizolvarea substanţelor solubile şi a coagula albuminele insolubile. După răcire, se filtrează prin hârtie de filtru sau vată pentru a opri grăsimile care sub această formă nu pot fi utilizate de bacterii. Se repartizează apoi zeama de carne în flacoane sterilizate care se închid cu dopuri de vată şi tifon. Se sterilizează 30 minute la 120°C. Acesta constituie maceratul de carne care se poate păstra steril, la rece, timp îndelungat şi constituie substanţa de bază pentru pregătirea mediilor lichide şi solide.

Pentru a produce un bulion cu calităţi nutritive superioare, poate fi folosit procedeul autoclavării maceratului de carne la 2 atm. În acest caz proteinele din carne sunt degradate într-o proporţie mai mare, până la stadiul de peptone şi aminoacizi, devenind mai accesibile.

Bulionul. La 1000 ml zeamă de carne se adaugă, la cald, 10 g peptonă şi 5 g NaCl, se amestecă totul şi se încălzeşte în continuare până la dizolvarea completă a peptonei. Se lasă să se răcească, se determină şi se corectează pH-ul. După aceasta, mediul se autoclavează timp de 15 minute la 120°C pentru precipitarea sărurilor alcalino-teroase. Pentru îndepărtarea precipitatului şi a resturilor de grăsimi se filtrează prin hârtie de filtru, iar apoi se repartizează steril în baloane sau eprubete sterile, care se închid cu dopuri; mediul repartizat se sterilizează 20 minute la 115°C.

BCU IAŞI

Pentru prepararea bulionului din extract de carne (Beef Extract Difco), la 1000 ml apă distilată se adaugă 3 g extract, 10 g peptonă şi 5 g NaCl.

Dacă se foloseşte produsul Nutrient Broth, atunci la 1000 ml apă distilată se adaugă numai 8 g Nutrient şi 5 g NaCl, întrucât acesta conţine peptonă. Substanţele se dizolvă prin încălzire, se corectează pH-ul mediului (7,2-7,6) cu o soluţie de NaOH 10% sau HCl 10%, se repartizează în recipiente şi se sterilizează.

Apa peptonată

În 1000 ml apă distilată se dizolvă, la cald, 10 g peptonă şi 5 g NaCl. Se corectează pH-ul la 7,8, se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în tuburi şi se sterilizează 20 minute la 121°C.

Peptonele întrebuinţate în microbiologie sunt substanţe care rezultă din digestia peptică a cărnii. Ele au o compoziţie complexă şi conţin, printre altele, albumoze, polipeptide şi peptone, deosebit de necesare metabolismului bacterian. Compoziţia lor variază după ţesutul şi specia animală care serveşte drept materie primă. O proprietate importantă este faptul că nu coagulează la căldură.

Geloza (agarul nutritiv)

Este un mediu solid ce se prepară din bulion prin adăugarea de agar ce se obţine din alge marine (*Gelidium, Gracillaria, Gelidiella*). Fibrele de agar se dizolvă în apă la temperatura de 80-90° C, constituind un lichid vâscos care se solidifică la temperatura de 45°C.

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Agarul este lipsit de proprietăţi nutritive, servind numai pentru solidificarea mediului.

Prepararea gelozei se face astfel: se taie fibrele de agar în fragmente mici şi se adaugă la bulionul preparat în prealabil, în proporţie de 15-20 g/l. Se verifică şi se corectează pH-ul. Amestecul încă fierbinte se filtrează prin vată, se repartizează în baloane sau tuburi ce se astupă cu dopuri şi se sterilizează 20 minute la 121°C. Pentru solidificarea gelozei turnată în tuburi, acestea se aşază în poziţie înclinată sau verticală.

Gelatina

Acest mediu se prepară prin adăugarea a 200 g gelatină la 1000 ml bulion încălzit la 70-80°C. Se stabileşte pH-ul al 7,4-7,6. După răcire la 60°C, mediul se clarifică prin adăugarea unui albuş de ou bătut în prealabil cu 50-60 ml apă distilată. Se autoclavează la 115°C, timp de 20 minute, după care se filtrează la cald prin hârtie de filtru.Mediul se repartizează în tuburi sterile şi se sterilizează 30 minute la 115°C. Tuburile cu gelatină nu se incubează la 37°C deoarece la 25°C mediul începe să se lichefieze.

Mediul nutritiv cu cartof

Tuberculii se spală şi ochii de îndepărtează cu un cuţit. Apoi tuberculii se introduc într-o soluţie de sublimat 0,1%, timp de o oră, se spală din nou şi se cojesc. Se taie în felii sau în pană, se introduc în cutii Petri sau eprubete cu o mică cantitate de apă pentru a

împiedica uscarea feliilor, se sterilizează fracţionat.

3.3.2. Prepararea mediilor complexe

Bulion-ser

Pentru prepararea acestui mediu se adaugă la bulionul propriu-zis ser de cal, bou, iepure, sau om în proporţie de 1/4 - 1/5, operaţie care se efectuează în mod steril. Sângele necesar obţinerii serului se recoltează în mod aseptic în baloane sterile prevăzute cu baghete de sticlă aşezate în cruciş. După coagularea sângelui, serul se decantează în condiţii sterile. Pentru o mai mare siguranţă se poate face controlul sterilităţii serului şi, dacă este cazul, se filtrează prin filtru Seitz.

Bulion-sânge

Se prepară prin adăugarea de sânge defibrinat la bulion în proporţie de 1 ml sânge la 8-10 ml bulion. Se foloseşte sânge de cal, bou, berbec sau iepure. Recoltarea sângelui se face într-un balon steril cu perle de sticlă. Balonul se agită timp de 10-15 minute pentru defibrinare şi evitarea coagulării. Sângele se poate păstra la temperatura de 4°C până la întrebuinţare.

Bulion-glucozat

Se prepară pornind de la bulionul propriu-zis, la care se adaugă glucoză în proporţie de 0,5 - 1%. Sterilizarea se face prin

tindalizare, la 100° C, timp de 30 minute, în 3 zile consecutiv.

Geloză-ser

Pentru prepararea gelozei cu ser, aceasta trebuie în prealabil topită, apoi se lasă să se răcească la 45°C. Se adaugă ser în proporţie de 1/3 - 1/5, se omogenizează, apoi se lasă să se solidifice în poziţia dorită. Controlul sterilităţii se poate face prin păstrarea la termostat timp de 24 ore.

Geloză-sânge

Înainte de adăugarea sângelui, geloza se topeşte şi apoi se răceşte la temperatura de 45-50°C. Dacă temperatura gelozei este mai ridicată, mediul are culoarea maronie. Geloza se repartizează fie în tuburi care se înclină, fie în plăci Petri.

3.3.3. Prepararea mediilor speciale

3.3.3.1. Medii de îmbogăţire

Mediul OCST (bulion-ou-cistină-ser-telurit):

Ser normal de bou	150	ml
Bulion glucozat 2‰	50	ml
Telurit de potasiu 2%	20	ml
Cistină 1%	2,2	ml
Gălbenuşuri de ou	2	buc.

Se folosesc ouă proaspete, se spală bine cu apă şi săpun şi se ţin 30 minute în alcool 70°, după care se usucă pe hârtie de filtru sterilă, apoi cu un tampon de vată cu tinctură de iod se şterge unul din capetele oului şi se deschide cu o foarfecă şi pensă sterilă. Se scurge albuşul, iar gălbenuşul se recoltează într-un balon steril cu perle de sticlă. Verificarea sterilităţii se poate face prin însămânţarea pe medii de cultură urmând ca prepararea mediului să se facă după 24 ore. După omogenizare, gălbenuşurile se amestecă cu ingredientele şi mediul se repartizează în tuburi, câte 3-4 ml. Mediul se foloseşte pentru izolarea bacililor difterici şi mai ales pentru diagnosticul purtătorilor de bacili.

Mediul cu selenit de sodiu (Leifson):

Biselenit de sodiu anhidru	2	g
Lactoză	2	g
Peptonă	2,5	g
Na_2HPO_4	2,5	g
NaH_2PO_4	2,5	g
Apă distilată	500	ml

Se dizolvă cantitatea de biselenit de sodiu în 100 ml apă distilată şi se sterilizează la 100°C timp de 30 minute. Aceasta este soluţia I. Celelalte ingrediente se dizolvă în 400 ml apă distilată (soluţia II). Sterilizarea este identică. Soluţia I are aspect limpede, fiind incoloră. Soluţia II prezintă un precipitat, din care cauză se lasă 24 ore la temperatura camerei, apoi se decantează peste soluţia I. pH-ul trebuie să aibă valoarea 7. Mediul se foloseşte la izolarea salmonelelor.

Mediul Chapman lichid:

Extract de carne	4	g
Peptonă Witte	10	g
NaCl	150	g
Lactoză	15	g
Apă distilată	1000	ml

Soluţia de lactoză se prepară separat, în 100-150 ml apă distilată. Celelalte substanţe se dizolvă, toate, la cald în restul de apă distilată, se corectează pH-ul la 7,6. Se autoclavează 30 minute la 121°C. Se filtrează prin hârtie de filtru şi se adaugă soluţia de lactoză. Se repartizează în eprubete sterile şi se autoclavează la 115°C, timp de 20 minute. Datorită concentraţiei ridicate de NaCl, mediul inhibă flora de asociaţie, permiţând dezvoltarea stafilococilor patogeni rezistenţi la concentraţia respectivă.

3.3.3.2. Medii selective

Mediul cu bilă uscată (Istrati-Meitert):

Geloză nutritivă 2% sau 3%	100	ml
Lactoză	1,5	g
Bilă de bou uscată la 105°C	0,8	g
Citrat de sodiu	0,8	g
Tiosulfat de sodiu	0,8	g
Citrat de fier	0,2	g
Soluţie de albastru de bromtimol	4	ml

Indicatorul se prepară astfel: se dizolvă 1 g albastru de bromtimol în 25 ml NaOH n/10 după care se adaugă 475 ml apă distilată.

La geloza nutritivă lichefiată se adaugă restul ingredientelor şi se încălzeşte la 80°C până la completa lor dizolvare. Se ajustează pH-ul la 7,3-7,4. Mediul se fierbe apoi 15 minute la baia de apă, se lasă să se răcească la 55°C şi se toarnă în plăci Petri. Pe acest mediu care neînsămânţat este de culoare verde, coloniile de *Salmonella* apar albastru-verzui, cele de *Escherichia coli* galbene şi cele de *Proteus* albastru-verzui cu centrul mai opac.

Mediul Levine (EMB-eosine methylene blue):

Peptonă	10 g
KH_2PO_4	2 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se fierbe până la completa dizolvare a ingredientelor. Se filtrează prin hârtie de filtru sau vată. După răcire, mediul se aduce la volumul iniţial cu apă distilată, pH-ul trebuie să fie 7,4. Se repartizează în baloane de 100 ml şi se sterilizează la 121°C, 30 minute. În momentul întrebuinţării se topeşte geloza pe baia de apă şi după răcire la 50°C se adaugă la 100 ml mediu, 5 ml soluţie sterilă de lactoză 20% (sterilizată la 110°C, 20 minute), 2 ml soluţie apoasă de eozină galbenă 2% şi 1,3 ml soluţie apoasă de albastru de metilen 0,5%. Eozina şi albastrul de metilen se sterilizează în prealabil. După omogenizare, mediul se toarnă în cutii Petri.

Mediul Levine are culoarea roşie violacee şi se foloseşte pentru analiza microbiologică a apei. Coloniile de *Escherichia coli* apar negricioase cu luciu metalic, în timp ce coloniile celorlalte enterobacterii apar colorate în roz.

Mediul Loewenstein:

Asparagină	3 g
KH_2PO_4	1 g
Citrat de sodiu	1 g
$MgSO_4$	1 g
Glicerină neutră	60 ml
Apă distilată	1000 ml

După dizolvarea substanţelor, amestecul se sterilizează la 100°C în autoclav cu capacul deschis timp de 2 ore, apoi se închide capacul şi se continuă sterilizarea la 110°C, timp de 15 minute. Aceasta reprezintă soluţia mamă care se poate păstra timp îndelungat la rece.

Pentru pregătirea mediului propriu-zis se amestecă într-un balon cu perle de sticlă 150 ml soluţie mamă cu 12 ml glicerină neutră şi 6 g făină de cartofi. După omogenizare se încălzeşte mai întâi la 100°C timp de 15 minute, apoi la 56°C timp de 60 minute.

În continuare se spală 5 ouă, apoi se ţin 30 minute într-o baie de alcool 70° şi se lasă să se usuce pe o hârtie de filtru sterilă. După uscare, unul din capete se badijonează cu tinctură de iod şi se deschide cu o foarfecă sterilă. Conţinutul a 4 ouă şi gălbenuşul celui de-al cincilea se transvazează într-un pahar şi se amestecă cu o baghetă sterilă, după care se adaugă în mediul încălzit la 56°C. În final, se mai

adaugă 5 ml dintr-o soluţie apoasă sterilă de roşu de Congo sau verde malachit 2%. Mediul se filtrează prin tifon steril, se repartizează în tuburi (6-7 ml), se coagulează pe baie de nisip la 80°C timp de 30 minute şi se sterilizează prin tindalizare la 80-85°C timp de 30 minute, în două zile consecutiv.

Mediul Loewenstein se foloseşte în vederea izolării şi cultivării bacilului tuberculos.

Mediul cu bulion-lactozat, bilă şi verde brilliant:

Peptonă	10 g
Lactoză	10 g
Apă distilată	500 ml

Se adaugă apoi 20 g bilă deshidratată de bou, care, în prealabil, a fost dizolvată în 200 ml apă distilată. Soluţia de bilă trebuie să aibă pH-ul 7,0 - 7,5. Volumul mediului se aduce la circa 975 ml, prin adăugarea de apă distilată. Se aduce pH-ul la 7,4 şi se adaugă 13,3 ml soluţie verde brilliant 0,1% în apă distilată. Se completează volumul la 1000 ml apă distilată după care se filtrează prin vată. Se repartizează câte 5 ml în eprubete sterile cu tuburi de fermentare Durham şi se sterilizează în autoclav la 110°C, timp de 30 minute.

3.3.3.3. Medii elective

Mediul Löeffler:

Bulion glucozat 1%	100 ml
Ser normal de bou (steril)	300 g

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se stabileşte pH-ul bulionului la 7,6 se amestecă bine cu serul şi se repartizează steril câte 5-7 ml în tuburi, apoi se coagulează la baie de nisip la 85-90°C timp de 30 minute. Pe acest mediu bacilul difteric se dezvoltă în 8-16 ore, pe când flora de asociaţie abia după 22-24 ore.

Mediul Bordet-Gengou:

Cartofi	1000 g
Apă distilată	200 ml
Glicerină	80 ml
NaCl	5 g
Agar pulvis (bacto)	40 g

Cartofii se curăţă şi se taie mărunt. Se toarnă apa distilată care conţine glicerină. După sterilizare la autoclav timp de 20 minute la 120°C se filtrează prin vată până ce se obţine un lichid foarte clar. Se amestecă apoi părţi egale de macerat de cartofi şi apă distilată glicerinată şi se adaugă clorura de sodiu şi agarul a cărui topire se face prin fierbere. După repartizarea în tuburi, mediul se sterilizează la 100°C timp de 30 minute. Înainte de însămânţare se adaugă 25-30% sânge defibrinat de om sau de berbec, recoltat steril. Pentru inhibarea florei asociate se recomandă să se adauge mediului de cultură 15-20 unităţi de penicilină pe ml.

Mediul Bordet-Gengou se utilizează pentru cultivarea agentului tusei convulsive (*Bordetella pertussis*).

BCU IAŞI

3.3.3.4. Medii diferenţiale

Mediul Drigalski:

Bulion de carne	1000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Lactoză	15 g
Turnesol soluţie 10%	60 ml
Agar	20 g

Ingredientele se dizolvă la cald. Se ajustează pH-ul la 7,4. Se autoclavează la 110°C, timp de 20 minute. Se filtrează prin hârtie de filtru. După repartizarea în eprubete se sterilizează din nou la 110°C timp de 20 minute. Mediul are culoare violet deschis şi se foloseşte pentru diferenţierea genurilor *Escherichia* şi *Salmonella*. Coloniile de *Salmonella* produc virarea culorii în albastru, iar cele de *Escherichia* în roşu.

Mediul Koser şi Simmons:

NaCl	5 g
$MgSO_4$	0,2 g
$(NH_4)_3PO_4$	1 g
Citrat de sodiu	2 g
Apă distilată	1000 ml

Se însămânţează cu ansa foarte puţin inocul. Speciile microbiene care folosesc citratul de sodiu ca unică sursă de carbon vor creşte, tulburând uniform mediul; adăugând agar 2% şi albastru de bromtimol ca indicator se obţine mediul solid Simmons.

BCU IAŞI

Bulion cu roşu neutru:

Într-un tub cu bulion se adaugă 1-2 picături roşu neutru, soluţie apoasă 2% sterilă. După însămânţare şi termostatare, se constată reducerea roşului neutru în foarte scurt timp. Dacă bacteriile au proprietăţi reducătoare slabe, se toarnă un strat de parafină lichidă la suprafaţa mediului, pentru ca reducerea să nu fie anihilată prin oxidarea în contact cu aerul.

3.3.3.5. Medii de conservare

Se folosesc ouă spălate cu apă şi săpun. După spălare, se introduc într-o soluţie fenică 5% sau în alcool pentru dezinfectare, apoi se scot pe o hârtie de filtru sterilă. Capetele oului se trec prin flacără apoi se deschid în condiţii de sterilitate lăsând conţinutul să curgă într-un cilindru gradat steril. Se adaugă apă distilată sterilă în proporţie de 10% sau ser fiziologic în proporţie de 1 : 3 şi se omogenizează cu o baghetă sterilă. Se filtrează prin hârtie de filtru şi se repartizează în tuburi sterile. Sterilizarea se face prin tindalizare, la baia de nisip.

Acest mediu se întrebuinţează pentru creşterea bacilului tuberculos sau pentru păstrarea tulpinilor bacteriene în laborator.

Agarul moale:

Este un mediu semisolid care se prepară asemănător gelozei, dar cantitatea de agar este de numai 2-5 g la 1000 ml bulion. Se foloseşte pentru cultivarea şi conservarea bacteriilor.

BCU IAŞI - BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

3.3.4. Determinarea reacției (pH) mediilor de cultură

pH-ul unei soluții este definit valoric de logaritmul zecimal cu semnul schimbat al concentrației ionilor de H^+.

Concentrația ionilor de H^+ și OH^- în apă sau în soluțiile apoase este foarte mică și produsul concentrației lor este egal cu 10^{-14}.

În apa pură concentrația ionilor de H^+ este egală cu concentrația celor de OH^- și este egală cu:

$$\sqrt{10^{-14}} = 10^{-7};\ \textit{deci:}$$

$$\log H^+ = \log OH^- = 10^{-7} = \frac{1}{10^7} = 7$$

Concentrația ionilor de H^+ crește după adăugarea unui acid (HCl) dar, corespunzător scade concentrația ionilor de OH^-, astfel că produsul concentrațiilor lor (H^+ x OH^-) rămâne constant și egal cu 10^{-14}.

pH-ul unei soluții variază între 0 și 14.

Ionizarea apei variază în raport cu temperatura, iar pH-ul variază între 7,45 la 0° și 6,65 la 37°C.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

Metode de determinare a pH-ului

Pentru determinarea pH-ului mediilor nutritive se folosesc 2 tipuri de metode:

1) Metode colorimetrice;

2) Metoda electrometrică.

Metode colorimetrice

Metoda indicatorilor coloraţi

Principiu. Metodele se bazează pe proprietatea unei substanţe (indicator) de a-şi schimba culoarea în funcţie de pH-ul soluţiei în care sunt dizolvate. Un colorant cu formula moleculară generală XH, în mediu alcalin cedează ionul de H^+ şi devine X^-; colorantul XH are o culoare iar după disociere, radicalul X^-, altă culoare. Trecerea se face printr-un fenomen de tautomerie, cu apariţia unor grupări cromofore.

Hârtia indicatoare de pH. Principiul utilizării sale este acelaşi ca şi pentru indicatorii coloraţi. Benzile de hârtie de filtru sunt impregnate cu indicatori de diferite culori; este suficient contactul dintre banda de hârtie şi soluţia al cărei pH urmează a fi determinat, culoarea indicatorului se schimbă, iar nuanţa obţinută este comparată cu eşantioanele colorate care însoţesc banda şi care au nuanţe diferite pentru fiecare valoare a pH-ului pe care o cuprinde.

Citirea culorii hârtiei indicatoare se realizează într-un interval de 15-30 sec. de constant cu picătura de soluţie care se depune pe hârtia indicatoare. Aceasta poate fi de spectru larg - acoperind toată scara de pH (0-14), dar erorile de lucru sunt mari, sau poate fi de

spectru limitat, pentru 1-2 unităţi de pH, eroarea de lucru fiind mult diminuată.

Indicatori de pH

Indicatorii de pH, sau acido-bazici sunt coloranţi organici, acizi slabi sau baze slabe, a căror culoare depinde de concentraţia ionilor H^+ sau OH^-, respectiv de pH. Modificarea culorii indicatorilor în funcţie de pH se explică după Kolthoff, printr-o modificare de structură care are loc odată cu modificarea gradului de disociere a indicatorului în funcţie de variaţia concentraţiei ionilor de hidrogen. Rezultă de aici că forma nedisociată a indicatorului are altă culoare şi structură decât forma ionizată. De exemplu, fenolftaleina, în stare nedisociată are o structură lactoidă şi este incoloră. Odată cu creşterea concentraţiei (OH^-) peste o anumită limită, trece în formă chinoidă, disociată, de culoare roşie. Metiloranjul, în stare nedisociată are o structură azoidă, de culoare galbenă; pe măsura creşterii concentraţiei (H^+) peste o anumită limită trece în forma chinoidă, disociată, de culoare roşie.

Modificarea culorii indicatorului nu se produce la un anumit pH, ci într-un anumit interval de pH. Se numeşte deci interval de viraj, intervalul de pH în afara căruia nu se mai observă o schimbare a culorii indicatorului (tabelul 2).

Orice indicator trebuie să îndeplinească anumite condiţii şi anume:

1. Să funcţioneze reversibil;
2. Schimabrea de culoare să se producă brusc, deci

într-un interval de pH cât mai redus;

3. Să fie suficient de solubil în apă, pentru ca soluția să fie suficient de colorată;

4. Să aibă o putere de colorare suficientă, astfel încât culoarea să fie ușor observată, chiar pentru concentrații reduse de indicator (10^{-4}, 10^{-5} M);

5. Schimbarea de culoare să se producă la adăugarea unor cantități mici de acizi sau baze, respectiv consumul acestora trebuie să fie atât de redus, încât să nu aducă erori de titrare;

6. Să fie stabil în soluție, în condițiile obișnuite de lucru, apă, lumină, oxigen, CO_2.

Tabelul 2

Indicatorii cei mai utilizați și modul lor de întrebuințare

Indicatorul	Intervalul de viraj pH	Culoarea		Cantitatea de indicator pentru 10 ml soluție
		acid	alcalin	
Albastru timol (A) (sare de sodiu)*	1,2-2,8	roșu	galben	1-2 picături soluție 0,1% în apă, sau în alcool 20%
Tropeolină 00 (B)	1,3-3,2	roșu	galben	1 picătură soluție 1% în apă
1-4 Dinitrofenol (A)	2,4-4,0	incolor	galben	1-2 picături soluție 0,1% în alcool 50%

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Indicatorul	Intervalul de viraj pH	Culoarea		Cantitatea de indicator pentru 10 ml soluție
		acid	alcalin	
Galben-metil (B) (Galben-dimetil)	2,9-4,0	roșu	galben	1 picătură soluție 0,1%
Metiloraj (B)	3,1-4,4	roșu	galben-portocaliu	1 picătură soluție 0,1% în apă
Albastru de brom fenol (A) (sare de sodiu)	3,0-4,6	galben	albastru-violet	1 picătură soluție 1% în apă, sau în alcool 20%
Alizarin sulfonat de sodiu (A)	3,7-5,2	galben	violet	1 picătură soluție 0,1% în apă
Verde de bromcrezol (A) (sare de sodiu)	4,0-5,6	galben	albastru	1 picătură soluție 0,1% în apă
Roșu metil (A) (sare de sodiu)	5,2-6,8	roșu	galben	1 picătură soluție 0,1% în apă
Purpură de brom-crezol (A) (sare de sodiu)	4,4-6,2	galben	purpuriu	1 picătură soluție 0,1% în apă
p-Nitrofenol (A)	5,0-7,0	incolor	galben	1-5 picături soluție 0,1% în apă
Albastru de brom timol (A) (sare de sodiu)	6,2-7,0	galben	albastru	1 picătură soluție 1% în apă, sau în alcool 20%
Azolitmin (A) (turnesol lacmus)	5,0-8,0	roșu	albastru	5 picături soluție 0,5% în apă

Indicatorul	Intervalul de viraj pH	Culoarea		Cantitatea de indicator pentru 10 ml soluție
		acid	alcalin	
Roşu fenol (A) (sare de sodiu)	6,4-8,0	galben	roşu	1 picătură soluție 1% în apă, sau în alcool 20%
Roşu neutral (B)	6,8-8,0	roşu	galben	1 picătură soluție 0,1% în alcool 70%
Acid rozolic (A)	6,8-8,0	galben	roşu	1 picătură soluție 0,1% în alcool 90%
Roşμ crezol (A) (sare de sodiu)	7,2-8,8	galben	roşu	1 picătură soluție 1% în apă, sau în alcool 20%
α-Naftolftaleină (A)	7,3-8,7	roz	verde	1-5 picături soluție 0,1% în alcool 70%
Tropeolină 100 (B)	7,6-8,9	galben	roz-roşu	1 picătură soluție 0,1% în apă
Albastru timol (A) (sare de sodiu)**	8,0-9,6	galben	albastru	1-5 picături soluție 0,1% în apă sau în alcool 20%
Fenolftaleină (A)	8,0-10,0	incolor	roşu	1-5 picături soluție 0,1% în apă sau în alcool 70%
Timolftaleină (A)	9,4-10,6	incolor	albastru	1 picătură soluție 0,1% în apă

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

Indicatorul	Intervalul de viraj pH	Culoarea		Cantitatea de indicator pentru 10 ml soluție
		acid	alcalin	
Galben de alizarină (A)	10,0-12,0 -	galben	liliachiu	1 picătură soluție 0,1% în apă
Tropeolină 0 (B)	11,0-13,0	galben	portocaliu-brun	1 picătură soluție 0,1% în apă
Nitromină (B)	11,0-13,0	incolor	portocaliu-brun	1-2 picături soluție 0,1% în alcool 70%

A = indicator acid;
B = indicator bazic;
• = pentru domeniu acid;
– = pentru domeniu bazic.

După cum se observă, unii indicatori sunt unicolori (fenolftaleine, timolftaleina, nitramina etc.), alții sunt bicolori. Sunt și indicatori tricolori, care au două intervale de viraj ca albastru-timol (1,2-2,8-roșu-galben, pentru domeniul acid și 8,0-9,6-galben albastru, pentru domeniul bazic).

Metoda electrometrică

Metoda electrometrică de determinare a pH este relativ rapidă și foarte precisă (indică cu trei zecimale diferența de tensiune dintre cei doi electrozi, care se află în soluția al cărei pH se măsoară și respectiv în soluția standard), dar necesită un aparat special - pH-metru. Acesta este de fapt un voltmetru, care permite măsurarea unei diferențe de potențial electric.

pH-metrul înregistrează diferenţele de potenţial care sunt generate de diferenţe ale concentraţiei ionilor de H^+, între un electrod de referinţă, care se află plasat într-o soluţie cu pH cunoscut şi un electrod de măsurare pentru pH-ul probei.

Electrozii de referinţă folosiţi cel mai adesea sunt: electrodul de calomel saturat şi electrodul de Ag-AgCl. Electrodul de măsurare a concentraţiei ionilor de H^+ este fie electrodul de H, de antimoniu, fie cel mai adesea, electrodul de sticlă. În ultimul timp firmele specializate produc electrozi de sticlă combinaţi care încorporează pe un suport unic, atât electrodul de referinţă cât şi pe cel de măsurare. Electrodul de sticlă face parte din clasa electrozilor de membrană.

Principiul de funcţionare al electrodului concentric de sticlă este următorul: o peliculă fină de sticlă specială separă două soluţii de pH diferit. Diferenţa de pH dintre cele două soluţii stabileşte o diferenţă de potenţial electric. Cele două soluţii diferite sunt: soluţia tampon (tampon ftalat acid de potasiu, tampon fosfat etc.), în care se găseşte electrodul de referinţă şi soluţia al cărei pH se determină.

Electrodul este o membrană de sticlă specială format din lanţuri de atomi de Si şi O. Cationii metalelor alcaline şi alcalino-teroase ocupă golurile din această reţea.

La suprafaţa de contact dintre membrana de sticlă şi soluţie, sub influenţa moleculelor de apă, cationii metalici părăsesc reţeaua şi trec în soluţie, fiind înlocuiţi cu ioni de H^+ din mediu. Ionii de H^+ hidrataţi din soluţie, transportă şi un număr de molecule de apă, ceea ce duce la o "umflare" a suprafeţei membranei.

BCU IASI

Deoarece funcţionarea electrodului de sticlă se bazează pe pătrunderea apei în reţeaua structurală a sticlei şi pe trecerea în soluţie a componentelor solubile, durata sa de funcţionare este limitată. Odată cu progresia trecerii în soluţie, în structura membranei de sticlă predomină scheletul rigid al atomilor de Si şi O şi rezistenţa electrică a electrodului creşte.

Electrodul de înregistrare, concentric cu cel de referinţă, este inclus în soluţie saturată (3 M) de KCl şi comunică cu soluţia al cărei pH se măsoară, printr-un mic orificiu. KCl are rolul de a face legătura între cei 2 electrozi (Fig. 9).

Folosirea pH-metrului este simplă, dar impune respectarea unor condiţii de lucru:

* Trecerea unui interval de timp între momentul contactului electrodului cu soluţia căreia i se măsoară pH-ul şi momentul înregistrării acestuia;

* Spălarea riguroasă în apă distilată a electrodului, înainte şi după utilizare, ţinând seama de fragilitatea membranei de sticlă a electrodului de referinţă;

* Electrodul nu rămâne în soluţia al cărei pH se determină, mai mult decât timpul necesar măsurării;

* Între 2 determinăride pH pentru 2 soluţii diferite se lasă un interval de timp;

* Electrozii se păstrează în uscat în cazul unei nefolosiri prelungite, în caz contrar se păstrează în soluţie de KCl;

BCU IASI

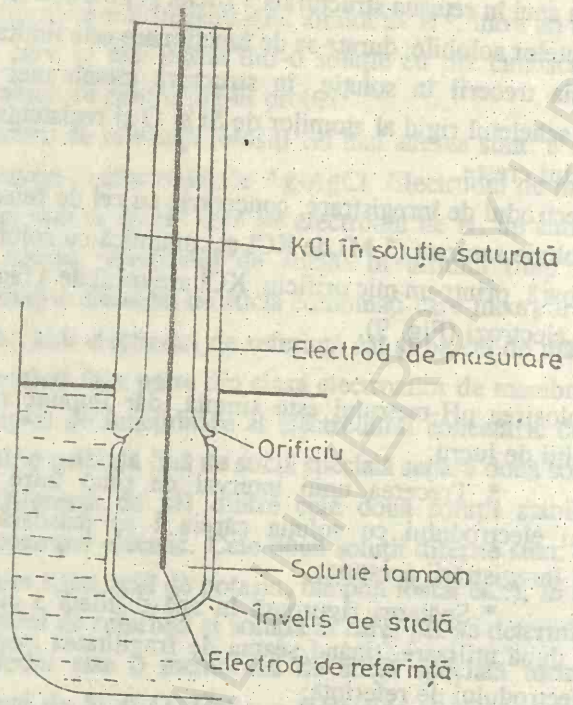


Fig. 9. Electrodul concentric de sticlă. Electrodul de referință vine în contact într-o soluție tampon cu pH cunoscut. Electrodul de măsurare vine în contact cu soluția al cărei pH se determină, printr-un orificiu foarte mic. Conexiunea electrică dintre cei doi electrozi este asigurată de soluția de KCl 3 M.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

* Se verifică permanent nivelul KCl din electrodul de înregistrare;

* Înainte de utilizare, electrozii noi se cufundă în HCl 0,1 N 4-6 ore;

* Nu se măsoară pH-ul unei soluţii în care se formează precipitat, sau care conţine concentraţii mari de proteine; astfel se riscă astuparea orificiului de comunicare a electrodului de KCl, cu soluţia căreia îi măsurăm pH-ul;

* Nu se măsoară pH-ul soluţiilor cărora dorim să le păstrăm constantă concentraţia de K^+ şi Cl^- pentru că ionii din electrod trec în soluţie.

4. ÎNSĂMÂNŢAREA MEDIILOR DE CULTURĂ. CULTURI ŞI COLONII MICROBIENE. OBŢINEREA CULTURILOR PURE

4.1. TEHNICI DE ÎNSĂMÂNŢARE

Însămânţarea unei culturi microbiene constă în depunerea produsului respectiv pe suprafaţa sau în profunzimea mediilor de cultură.

Instrumentele folosite pentru efectuarea unei însămânţări sunt **ansele de însămânţare şi pipetele Pasteur sau gradate.** Ansele sunt formate dintr-un fir de platină îndoit sub formă de buclă la o extremitate şi montat pe un mâner de metal sau ebonită (Fig. 10).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

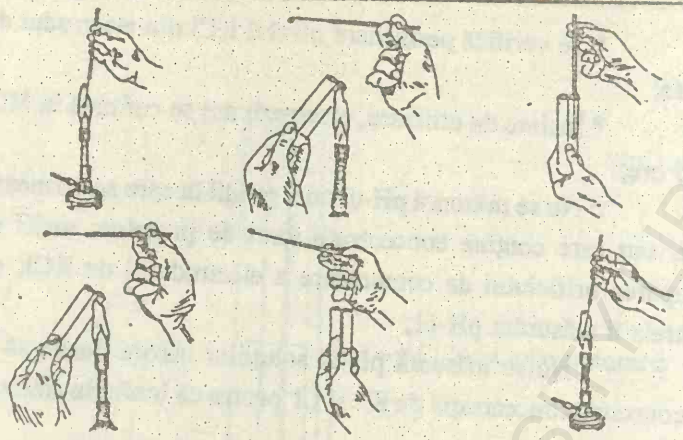


Fig. 10. Tehnica însămânţării unei culturi microbiene cu ajutorul ansei.

Operaţiunea de însămânţare trebuie făcută cu toate precauţiile de asepsie, folosind medii de cultură sterile şi instrumente sterile şi numai sub protecţia unei flăcări pentru a se evita introducerea în mediile de cultură a altor microorganisme decât cele prezente în produsul însămânţat. Deschiderea recipientelor în care se găsesc mediile şi produsul de însămânţat se face cu mare atenţie, în apropierea unei flăcări; gura recipientelor se flambează. De asemenea, trebuie flambate ansa sau pipeta cu care se efectuează însămânţarea atât înainte cât şi după această operaţiune. După flambare este necesar ca ansa sau pipeta să fie lăsate să se răcească înainte de a le pune în contact cu produsul de însămânţat, deoarece temperatura ridicată distruge microorganismele.

Pentru realizarea condiţiilor de asepsie, însămânţarea se face în încăperi lipsite de curenţi de aer (sau chiar în boxe sterile),

BCU IAŞI

persoana nu vorbeşte, poartă bonetă, eventual şi mască.

Conduita unei însămânţări este următoarea:

♦ instrumentul cu care se face însămânţarea se ţine în mâna dreaptă cât mai aproape de extremitatea opusă celei care se introduce în recipient şi se sterilizează în flacără. Ansa se ţine ca un creion iar pipetele se ţin între degetul mare şi mijlociu cu arătătorul aplicat pe orificiul astupat cu vată;

♦ recipientul din care se prelevă sau în care urmează a fi depus materialul manipulat se ţine de extremitatea inferioară în mâna stângă în aşa fel încât conţinutul şi traiectul instrumentului să poată fi permanent controlat cu vederea;

♦ se scoate dopul recipientului cuprinzându-l între degetul mic şi palma mâinii drepte. Cât timp recipientele sunt fără dop se vor menţine înclinate pentru a evita depunerea în interiorul lor a particulelor de praf din atmosferă;

♦ se sterilizează prin flambare gâtul şi gura recipientului prin rotirea în flacără timp de câteva secunde;

♦ se introduce instrumentul şi se face prelevarea materialului după care se retrage cu grijă pentru a evita atingerea pereţilor şi mai ales a gurii şi gâtului recipientului;

♦ se lasă jos recipientul cu produs şi se ia tot cu mâna stângă recipientul în care se face însămânţarea, deschizându-l în mod asemănător;

♦ se depune materialul de însămânţat în recipientul respectiv şi se închide cu dopul;

♦ după terminarea operaţiei se sterilizează ansa fără a se introduce direct bucla în flacără, căci urmele de lichid pot intra

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

brusc în fierbere stropind şi deci contaminând suprafeţele din jur. Ansa se trece de mai multe ori prin flacără până când bucla şi toată lungimea firului se înroşesc. Pipetele se introduc în cilindrul pentru pipete infecte; ele nu se flambează.

Când recipientul cu produs şi cel în care se face însămânţarea sunt eprubete, acestea se pot ţine odată în mâna stângă deschizându-le simultan (Fig. 10). Celelalte operaţii sunt identice.

Însămânţarea în medii lichide

Dintr-o cultură sau dintr-un produs lichid se iau cu ajutorul pipetei Pasteur câteva picături care sunt introduse apoi, cu precauţiile expuse mai sus, în profunzimea mediului lichid.

În cazul în care produsul de însămânţat este o cultură microbiană pe mediu solid sau un produs semisolid, se ia cu ansa o cantitate mică din acesta şi se suspensionează în mediul de cultură omogenizând amestecul cu ansa pe peretele tubului.

Însămânţarea pe suprafaţa mediilor solide

Atunci când trebuie însămânţat un produs sau o cultură din mediu lichid, se ia cu o pipetă Pasteur sau cu ansa o picătură din produsul respectiv, după care acesta se disemineză pe suprafaţa mediului de cultură din eprubete sau cutii Petri. Însămânţarea se poate face fie cu ansa descriind striuri (Fig. 11), fie prin înclinarea tubului sau a plăcii cu mediu în aşa fel încât produsul să fie repartizat pe toată suprafaţa mediului.

BCU IAŞI

Fig. 11. Însămânţarea în striuri, pe suprafaţa mediilor solide.

Însămânţarea în profunzimea mediilor solide

Însămânţarea în profunzimea mediilor solide se face prin încorporare sau prin înţepare.

Pentru însămânţarea prin încorporare, mediile (geloză, gelatină) se topesc în baia de apă şi se răcesc la 45°C. Se introduce apoi o cantitate din produsul de însămânţat. Se omogenizează amestecul prin rularea tuburilor (eprubetelor) între palme fără a se produce bule de gaz, după care mediile însămânţate sunt lăsate să se solidifice (Fig. 12).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 12. Omogenizarea amestecului prin rularea tubului între palme.

Însămânţarea prin înţepare se efectuează cu ajutorul firului ansei după ce a fost încărcat cu produs (Fig. 13).

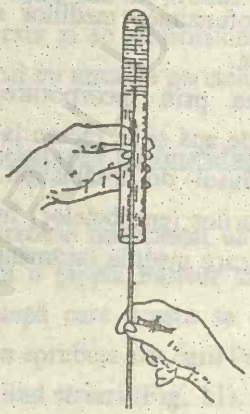


Fig. 13. Însămânţarea prin înţepare.

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

4.2. OBȚINEREA CULTURILOR PURE

O cultură pură conține o singură specie sau tulpină microbiană. Numai cu o cultură pură sunt posibile următoarele studii:

- morfologice (forma și mărimea celulelor);
- culturale (caracteristicile de creștere ale culturii pe diferite medii);
- fiziologice sau biochimice;
- de patogenitate (proprietatea microorganismelor de a produce boli la plante sau animale);
- serologice (studiul antigenelor celulare și a anticorpilor serici);
- genetice (variabilitatea, sexualitatea);
- bacteriofagi specifici.

Deși în natură se găsesc culturi pure, frecvența cu care se află într-un mediu este considerată mică. O cantitate mică de sol fertil poate conține o varietate considerabilă de virusuri, bacterii heterotrofe și autotrofe și multe specii de drojdii, alge, ciuperci microscopice și protozoare. Aceste microorganisme pot exista ca saprofite, comensale, simbionte sau antagoniste.

Pentru izolarea unui anumit microorganism în cultură pură se pot folosi tipuri speciale de medii. În general, sunt folosite mediile de îmbogățire, selective sau diferențiale.

Agenții de îmbogățire și de selecție pot fi chimici sau fizici.

Pentru izolarea microorganismelor termofile, mediul însămânțat se incubează la o temperatură ridicată (50°C sau mai mare).

Pentru izolarea microorganismelor halofile de adaugă în mediu NaCl 10%; pentru izolarea bacteriilor osmofile se adaugă o soluţie concentrată de zaharoză. Multe bacterii plasmolizează în asemenea medii în timp ce bacteriile halofile sau osmofile nu sunt afectate. De asemenea, pentru izolarea unor anumite tipuri de bacterii se utilizează o anumită valoare de pH a mediului, adăugarea de antibiotice specifice sau crearea de condiţii de anaerobioză.

Folosirea efectivă a acestor metode pentru izolarea unei culturi pure pretinde cunoaşterea caracteristicilor fiziologice şi biochimice ale microorganismelor.

Tehnicile de izolare diferă în funcţie de tipul de microorganisme: aerobe sau anaerobe[1].

Obţinerea unui microorganism aerob în cultură se poate efectua prin mai multe metode:

- izolarea pe medii solide obişnuite, prin diluarea produsului cu obţinerea de colonii izolate pornind de la considerentul că o colonie provine din multiplicarea unei celule;
- izolarea prin însămânţări pe medii speciale de cultură, favorabile dezvoltării numai a anumitor specii microbiene;
- izolarea bazată pe diferenţele de comportare a bacteriilor faţă de agenţi fizici, chimici şi biologici;
- izolarea prin metode biologice, folosind animale de laborator.

[1] Izolarea şi cultivarea microorganismelor anaerobe vor fi prezentate în capitolul 8.1.2.

4.2.1. Izolarea pe medii solide

Se realizează prin metoda diluţiilor succesive şi prin metoda diseminării pe suprafaţa mediului.

Metoda diluţiilor succesive. Cultura sau materialul care conţine microorganisme este diluată în apă sterilă, utilizând un anumit coeficient de diluare, de obicei egal cu 10. În acest fel, se obţine o serie de diluţii în care numărul celulelor scade în progresie geometrică. Pentru prepararea diluţiilor, apa sterilă este repartizată în eprubete uscate sterile, câte 9 ml în fiecare. Apoi 1 ml din suspensia iniţială luat cu o pipetă sterilă este transferat în prima eprubetă cu 9 ml apă sterilă. Aceasta este diluţia 1/10 (10^{-1}). Suspensia obţinută este amestecată foarte bine cu ajutorul pipetei prin barbotare, ceea ce asigură o bună omogenizare a suspensiei şi se reduce aderarea celulelor de pereţii eprubetei şi pipetei. Apoi, cu aceeaşi pipetă se ia 1 ml din diluţia 1/10 (10^{-1}) şi se transferă în a doua eprubetă; aceasta este diluţia 1/100 (10^{-2}). În acelaşi mod se pregătesc şi următoarele diluţii: 1/1 000 (10^{-3}); 1/10 000 (10^{-4}); 1/100 000 (10^{-5}); ş.a.m.d. Din ultimele tuburi de diluţie se fac însămânţări pe geloză turnată în tuburi sau în plăci Petri (Fig. 14).

Diluarea produsului poate fi făcută şi direct în tuburi cu gelatină sau geloză topită şi răcită la 45°C, care după aceea este turnată în plăci Petri. În fine, diluţiile se mai pot realiza prin treceri succesive în lichidul de condensare al mai multor tuburi cu geloză înclinată, cu răspândirea ulterioară a acestuia pe toată suprafaţa mediului de cultură din fiecare tub prin mişcări de înclinare a

acestora.

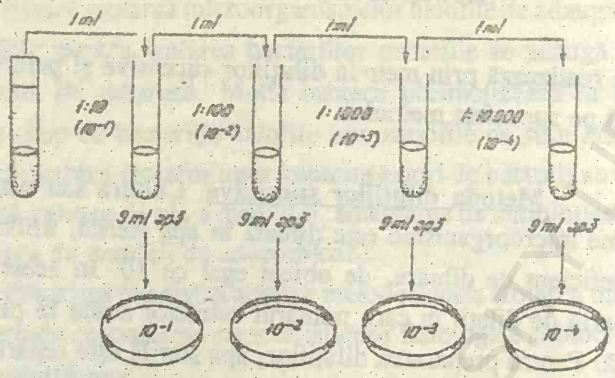


Fig. 14. Tehnica diluţiilor succesive şi procedeul turnării în plăci.

După incubare, coloniile izolate dezvoltate pe suprafaţa gelozei vor fi trecute cu ansa în tuburi.

Metoda diseminării pe suprafaţa mediului. Diseminarea se poate face pe suprafaţa gelozei înclinată în tuburi sau turnată în plăci.

În primul caz, se încarcă ansa cu produsul respectiv, şi se însămânţează în zig-zag în 3-4 tuburi succesive, fără a reîncărca ansa, până la epuizarea produsului.

În cel de-al doilea caz, după încărcarea ansei, se însămânţează în striuri mai multe plăci, tot până la epuizarea produsului de pe ansă (Fig. 15).

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

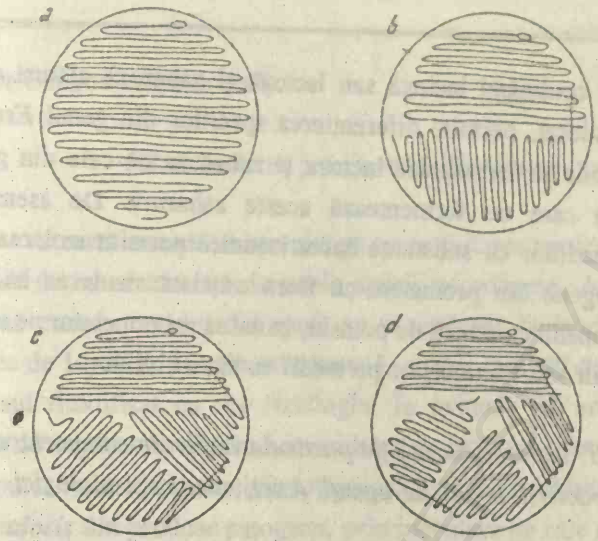


Fig. 15. Tehnica obţinerii de colonii pure prin epuizarea produsului de pe ansă: a. epuizare continuă; b., c., d. epuizare în mai multe faze.

După incubare la temperatura corespunzătoare microorganismului pe care dorim să-l izolăm, se observă că în primele tuburi sau pe primele striuri din plăci coloniile sunt confluente dar în ultimele coloniile sunt izolate şi pot fi repicate şi trecute mai departe în cultură pură.

4.2.2. Izolarea prin însămânţare pe medii speciale

Există medii de cultură care, datorită compoziţiei lor speciale, evidenţiază anumite caractere metabolice ale unor microorganisme, ceea ce permite separarea speciilor între ele. Astfel folosirea mediilor

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

diferenţiale conţinând lactoză sau lactoză şi zaharoză alături de un indicator colorat, permite diferenţierea speciilor din genul *Escherichia*, capabile să fermenteze lactoza şi zaharoza de cele din grupul *Salmonella* care nu fermentează aceste zaharuri. De asemenea, folosirea mediilor cu substanţe bacteriostatice permite izolarea unor specii patogene din produsele cu floră asociată: izolarea bacilului difteric pe medii cu telurit de potasiu, izolarea salmonelelor pe mediul Wilson-Blair sau a shigelelor pe medii cu săruri biliare.

4.2.3. Izolarea bazată pe particularităţile de comportare a bacteriilor faţă de agenţii fizici, chimici şi biologici

Particularităţile de comportare faţă de aceşti agenţi pot servi pentru izolarea anumitor specii în felul următor:

- folosind diferenţele de termorezistenţă (separarea enterococului rezistent la 60°C de alţi coci Gram-pozitivi sensibili la această temperatură sau separarea bacteriilor sporulate rezistente la 80°C de cele nesporulate;
- folosind diferenţele de rezistenţă la agenţi chimici, se poate izola prin tratare cu hidroxid de sodiu *Mycobacterium tuberculosis* în stare pură, dintr-un produs cu floră asociată;
- folosind toleranţa unor microorganisme faţă de unele substanţe chimice (izolarea stafilococului pe medii hiperclorurate sau a clostridiilor patogene pe medii cu fenol);
- folosind acţiunea selectivă a antibioticelor, se pot izola dintr-un produs cu floră asociată microorganisme rezistente la antibioticul respectiv (izolarea agentului tusei convulsive pe mediul

Bordet-Gengou cu penicilină).

4.2.4. Izolarea prin metode biologice

Această metodă se bazează pe receptivitatea particulară a unor animale de laborator faţă de unele specii microbiene. Astfel pentru izolarea pneumococului din spută se procedează la inocularea unui şoarece de 16-20 g, pe cale subcutanată, a unei cantităţi de 0,5 ml din produsul fluidificat cu ser fiziologic. În primele 24 ore şoarecele moare de septicemie şi prin hemocultură se izolează pneumococul în stare pură. Pe acelaşi principiu se bazează izolarea lui *Mycobacterium tuberculosis* din produse patogene, prin inoculare pe cale subcutanată la cobai.

Pentru ca microorganismele să se poată dezvolta, mediile nutritive însămânţate sunt incubate la temperaturi corespunzătoare dezvoltării microogansimului studiat.

Incubarea se face în aparate speciale numite termostate (Fig. 16) prevăzute cu termometre de contact care permit reglarea temperaturii dorite.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

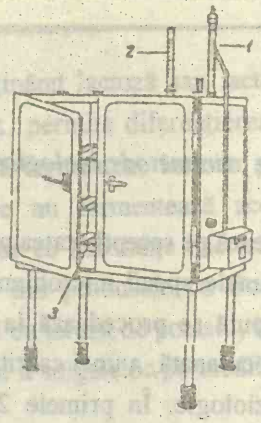


Fig. 16. Termostat: 1. termometru de contact; 2. termometru pentru indicarea temperaturii din interior; 3. rafturi.

4.3. CULTURILE ŞI COLONIILE MICROBIENE

Cultivarea microorganismelor se poate face în medii lichide şi pe medii solide.

Cultivate în medii lichide, microorganismele formează culturi al căror aspect este diferit în funcţie de grup, de specie şi de proprietăţile fizico-chimice ale mediului. Culturile prezintă o serie de caracteristici care pot fi utile pentru identificarea speciilor cultivate şi pentru eventualele forme de variabilitate:

- gradul de tulburare a mediului; formarea de sediment; formarea de peliculă la suprafaţa mediului; formarea de văl sau inel etc.;
- mirosul pe care îl degajă cultura;
- pigmentarea culturii; felul pigmentului.

BCU IASI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Astfel *Staphylococcus aureus* tulbură uniform mediul; *Escherichia coli* tulbură bulionul cu formarea de unde mătăsoase, iar *Streptococcus* şi *Bacillus anthracis* tulbură mediul după care formează un depozit floconos. *Streptococcus faecalis* formează un depozit vâscos.

Unele specii care nu tulbură mediul formează o peliculă sau un văl la suprafaţă care poate fi subţire şi fragil (*Corynebacterium diphtheriae*), compact şi plisat (*Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus*), gros şi gofrat (*Mycobacterium tuberculosis*) sau vâscos (*Pseudomonas aeruginosa*). *Klebsiella pneumoniae* formează la suprafaţa mediului un inel.

Actinomicetele cresc sub formă de colonii şi în mediile lichide. Pe astfel de medii, cultivate în profunzime, cele mai multe specii nu mai formează spori. În aceste condiţii, miceliul se fragmentează în celule mici, bacilare sau cocoide.

Mucegaiurile formează la suprafaţa mediilor lichide o pânză miceliană, ceea ce face ca diferitele părţi ale miceliului să se găsească în condiţii diferite de aerobioză.

Cultivate pe medii solide, microorganismele se dezvoltă sub formă de colonii. Colonia reprezintă o populaţie celulară rezultată din creşterea şi multiplicarea uneia sau a mai multor celule aparţinând aceleiaşi specii sau tulpini.

Caracterizarea morfologică a coloniilor implică precizarea următoarelor aspecte (Fig. 17):

- dimensiunile (în condiţii favorabile sunt destul de caracteristice: 1 mm la streptococ; câţiva mm la bacili; 1 cm şi chiar mai mult la levuri);

BCU IASI

- forma (punctiformă, rotundă, filamentoasă, neregulată, rizoidă, fusiformă etc.);
- aspectul marginii (întreagă, ondulată, lobată, dinţată, filamentoasă, buclată);
- profilul coloniei (plat, ridicat, convex, emisferic, umbonat);
- consistenţa (vâscoasă, mucilaginoasă, uscată);
- transparenţa sau opacitatea;
- culoarea şi aderenţa.

După aspectul morfologic, la bacterii au fost descrise două tipuri principale de colonii: **colonii S** (smooth = neted) şi **colonii R** (rough = rugos).

Coloniile de tip S sunt netede, bombate, cu suprafaţa strălucitoare şi marginile regulate. Se desprind uşor de pe substrat, formează suspensii, omogene în soluţie salină izotonică (NaCl 8,5‰), tulbură uniform bulionul. În cazul speciilor capsulate, celulele prezintă capsulă. La speciile patogene, tulpinile cu colonii S sunt virulente.

Coloniile de tip R sunt turtite, cu suprafaţa zbârcită, aspră, cu margini neregulate, dinţate. Sunt aderente de substrat; în soluţie salină izotonică aglutinează spontan; în bulion se dezvoltă greu, formând sediment. Celulele sunt necapsulate chiar dacă aparţin unei specii capsulate. În cazul speciilor patogene, tulpinile cu colonii R sunt nevirulente sau au virulenţă slabă. Excepţie fac *Mycobacterium tuberculosis* şi *Bacillus anthracis* .

BCU IASI

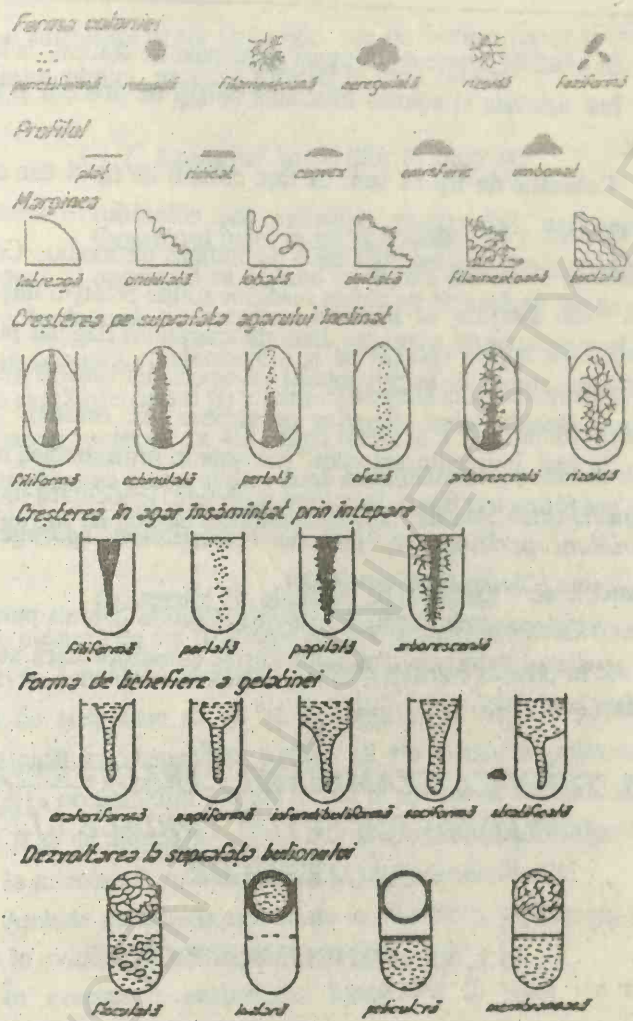


Fig. 17. Morfologia coloniilor şi aspectul creşterii bacteriilor pe medii de cultură.

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

În afară de aceste două tipuri principale de colonii, la bacterii au mai fost descrise şi colonii mucoase de tip M precum şi colonii mobile.

Coloniile de tip M sunt de fapt colonii de tip S dar celulele sunt capsulate. Substanţele capsulare dau coloniilor o consistenţă mucoasă-vâscoasă, cu tendinţa de a se întinde pe mediu. Coloniile mobile se pot deplasa pe suprafaţa mediilor solide printr-o mişcare de rotaţie levogiră sau de translaţie datorată aparatului flagelar puternic. Se întâlnesc numai la bacilii mobili cu spori deformanţi (*Bacillus circulans, Bacillus alvei, Bacillus sphaericus var. rotans*).

În fine, bacteriile anaerobe, cultivate în profunzimea mediilor solide, pot forma trei tipuri de colonii profunde: lenticulare-biconvexe (*Clostridium perfringens*), pufoase (*Clostridium sporogenes*) şi arborescente (*Clostridium septicum*).

Actinomicetele formează pe medii solide colonii pufoase, al căror aspect se datoreşte conidioforilor şi conidiilor care se află la suprafaţa coloniei.

5. TEHNICA EXAMINĂRII CARACTERELOR MORFOLOGICE ŞI TINCTORIALE ALE BACTERIILOR

5.1. EXAMENUL MICROSCOPIC

Celula bacteriană, datorită dimensiunilor ei, nu poate fi observată cu ochiul liber, ci numai cu ajutorul microscoapelor. În vederea examenului microscopic, bacteriile pot fi examinate în stare

vie, într-o suspensie în ser fiziologic, sau pe frotiuri fixate şi colorate după diferite tehnici, practică folosită în mod curent.

5.1.1. Examenul bacteriilor în stare vie

Examenul între lamă şi lamelă - pe o lamă de sticlă bine curăţată şi degresată se depune cu pipeta Pasteur o picătură din suspensia bacteriană de cercetat: picătura se acoperă cu o lamelă curată; se coboară condensatorul şi se închide parţial diafragma de câmp; se aşază preparatul pe platina orizontală şi se examinează cu un obiectiv uscat, puternic (x 40), după trecerea a 3-4 minute, necesare pentru stabilizarea preparatului; după examinare preparatul se depune într-un borcan cu soluţie dezinfectantă (ex. amestec sulfo-cromic).

Examenul în picătură suspendată - pe o lamelă se depune o picătură de ser fiziologic în care se suspensionează bacteriile de observat. Lamela se răstoarnă printr-o mişcare rapidă, în aşa fel ca picătura de suspensie să nu se prelingă şi se depune pe o lamă excavată;picătura suspendată trebuie să fie deasupra godeului, iar manipularea preparatului trebuie făcută în aşa fel ca picătura să nu se prelingă şi să nu ajungă în contact cu pereţii godeului. Se examinează imediat la microscop cu un obiectiv uscat puternic (x 40).

Ambele metode de examinare la microscop se folosesc pentru punerea în evidenţă a mobilităţii bacteriilor.

În executarea examenului bacteriilor în stare vie trebuie respectate următoarele reguli:

- când se execută suspensia trebuie avut grijă ca lama

şi pipeta sau firul metalic al ansei de însămânţare să fie bine răcite, pentru a nu omorî microorganismele prin căldură;

- examenul microscopic trebuie făcut cât mai rapid după depunerea culturii pe lamă sau executarea suspensiei pentru a nu se usca.

5.1.2. Examenul bacteriilor în frotiuri colorate

Tehnica executării frotiurilor - În vederea examinării, bacteriile sunt depuse pe o lamă sterilă de sticlă. Operaţiunea de întindere a materialului bacterian pe lamă este denumită, în mod curent, "executarea unui frotiu", termenul de frotiu fiind utilizat pentru desemnarea lamei cu material microbian etalat pe suprafaţa ei.

Pentru prepararea frotiurilor se folosesc lame de sticlă curate şi bine degresate. Degresarea se face prin păstrarea lamelor în alcool şi prin trecerea lor apoi prin flacăra becului de gaz, în aşa fel ca ambele feţe să fie flambate la fiecare trecere pe toată suprafaţa lor. Frotiurile se execută fie cu ajutorul ansei, fie cu pipeta Pasteur.

Materialele din care se execută aceste frotiuri sunt, de regulă, diferite organe patologice, recoltate de la animale vii sau de la cadavre, precum şi culturi bacteriene.

Timpii de efectuare ai frotiului sunt următorii (Fig.18):

- etalarea;
- uscarea la temperatura camerei;
- fixarea prin căldură;
- colorarea.

Etalarea - se întinde produsul de examinat pe lamă cu ajutorul unei anse de platină sau cu pipeta Pasteur în aşa fel încât să obţinem un strat subţire şi uniform, pe o suprafaţă de aproximativ 2 cm^2 care să cuprindă centrul lamei şi să nu atingă marginile ei.

Dacă produsul de examinat este o cultură microbiană într-un mediu lichid, se depune cu pipeta Pasteur o picătură de cultură în centrul lamei şi apoi se întinde. Dacă produsul de cercetat este o cultură pe mediu solid, se emulsionează o porţiune dintr-o colonie într-o picătură de ser fiziologic sau apă distilată pusă pe lamă, după care se întinde.

Frotiul astfel executat se lasă să se usuce la temperatura camerei sau la termostat.

Fixarea - este o condiţie absolut necesară în tehnica coloraţiei bacteriene. Prin fixare se produce denaturarea proteinelor microbiene care duce pe de o parte la moartea bacteriilor deci înlătură posibilitatea de infectare, iar pe de altă parte face ca preparatul să adere de lamă. Denaturarea proteinelor celulare prin procesul de fixare se pare că ar avea rol şi în mecanismul intim al coloraţiei, în sensul că măreşte afinitatea acestor proteine pentru colorant. Pentru fixare se foloseşte cel mai frecvent căldura.

Fixarea prin căldură se face trecând lama de câteva ori, cu frotiul în sus, prin flacăra unui bec de gaz. Fixarea nu trebuie să dureze mai mult de 5-10 secunde, iar temperatura nu trebuie să fie prea ridicată, pentru a nu modifica structura celulei bacteriene.

După ce frotiul a fost fixat se trece la colorare.

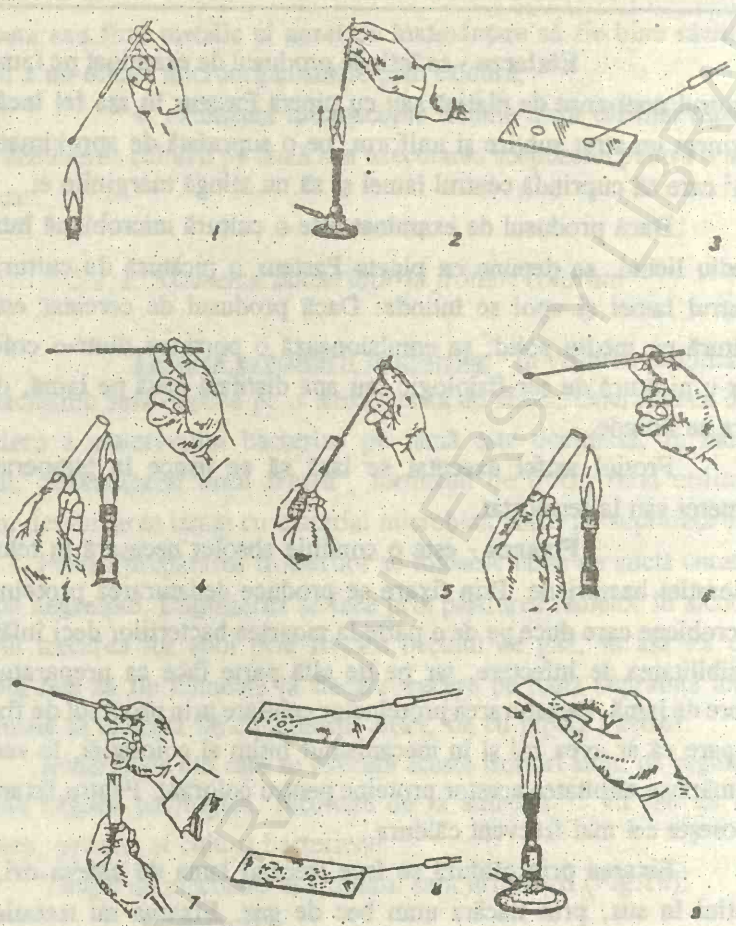


Fig. 18. Tehnica preparării frotiurilor. 1, 2. sterilizarea ansei; 3. depunerea pe lamă a unei picături de apă sterilă; 4, 5, 6, 7. modul de încărcare a ansei cu cultură bacteriană; 8. etalarea culturii pe lamă; 9. fixarea prin căldură.

BCU IASI UAIC UNIVERSITY LIBRARY

5.2. METODE DE COLORARE

În tehnica coloraţiilor bacteriene deosebim trei tipuri de metode:

- metode simple;
- metode compuse sau diferenţiale;
- metode speciale.

5.2.1. Coloraţia simplă

Coloraţia simplă utilizează un singur colorant de obicei bazic şi permite stabilirea morfologiei bacteriene şi punerea în evidenţă a elementelor celulare din produsele patologice.

Pentru coloraţia simplă se întrebuinţează cel mai frecvent soluţia de albastru de metilen sau fucsină fenicată Ziehl diluată 1/10. Mai rar utilizate sunt soluţiile de violet de metil, violet de genţiană, albastru de toluidină etc.

Tehnica:

Se acoperă frotiul uscat şi fixat cu soluţia colorantă:

- se ţine 1-2 minute;
- se varsă colorantul, se spală cu apă de robinet, se usucă;
- se examinează cu obiectivul cu imersie (90 x sau 100 x).

În general, în coloraţia simplă, bacteriile iau culoarea colorantului utilizat. Unii coloranţi, în prezenţa anumitor structuri celulare, îşi modifică culoarea realizând metacromazia, fenomen prin

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care, după colorare, celulele bacteriene sau numai părţi ale acestora apar colorate altfel decât colorantul folosit. Acest fenomen a fost explicat prin punerea în libertate a bazei colorate, care prezintă un alt spectru de absorbţie decât sarea colorată.

5.2.2. Coloraţii compuse

Dintre coloraţiile compuse, coloraţia Gram şi coloraţia Ziehl-Neelsen, au cea mai largă utilizare în bacteriologie.

a. Coloraţia Gram

Material necesar:

- violet de metil, soluţie apoasă (0,2%), sau violet de genţiană;
- soluţie Lugol;
- alcool - acetonă 1/10;
- fucsină Ziehl diluată 1/10 sau soluţie de safranină.

Tehnica coloraţiei Gram - Coloraţia Gram cuprinde patru timpi:

- **Colorarea** - se acoperă frotiul uscat şi fixat cu soluţie de violet de metil, se ţine 1-2 minute, se varsă colorantul şi se spală frotiul cu apă de robinet.
- **Mordansarea** - se acoperă frotiul cu soluţie Lugol, se ţine 4-5 minute, apoi se varsă.

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

- **Decolorarea** - este timpul cel mai important al colorației. Fără a se spăla, se acoperă frotiul cu alcool-acetonă 1/10, înclinându-se lama pentru a ușura acțiunea decolorantului. Se decolorează până când colorantul de pe lamă nu mai trece în soluție, frotiul devenind alburiu. Se spală repede cu apă de robinet pentru a opri acțiunea decolorantului.

- **Recolorarea** - se acoperă frotiul cu fucsină diluată 1/10 sau cu soluție de safranină, se menține colorantul 1-2 minute, după care frotiul se spală cu apă, se usucă și se examinează cu obiectivul cu imersie.

Metoda de colorație Gram introdusă în bacteriologie în 1884, completată ulterior, a permis gruparea bacteriilor în Gram pozitive, Gram negative și Gram variabile.

Bacteriile care rezistă la decolorarea cu alcool-acetonă sunt numite Gram pozitive și apar colorate în violet.

Bacteriile care se decolorează sub acțiunea alcool-acetonei și se recolorează cu fucsină fenicată diluată 1/10, sunt numite Gram negative și apar colorate în roșu.

Bacteriile Gram variabile pot fi atât Gram pozitive cât și Gram negative.

Mecanismul colorației Gram

Prima fază corespunde absorbției și difuziunii colorantului bazic (violetul de metil, violetul de gențiană) în interiorul citoplasmei.

Mordantul (soluția Lugol) reacționează cu colorantul dând naștere unui complex insolubil.

La celulele bacteriilor Gram pozitive complexul mordant -

colorant este puternic fixat de structura polizaharido-ribonucleoproteică a peretelui celular şi a membranei citoplasmatice. Decolorarea prin alcool-acetonă corespunde solubilizării complexului mordant-colorant în celulele Gram negative. Consecutiv procesului de solubilizare, colorantul este antrenat odată cu decolorantul în afara celulei bacteriilor.

În cazul bacteriilor Gram pozitive, decolorantul nu poate realiza solubilizarea complexului colorant-mordant, acesta fiind fixat pe ribonucleatul de magneziu.

Ultima fază, de fapt o fază auxiliară, corespunde recolorării celulelor care au fost decolorate cu alcool-acetonă. Aceasta se realizează cu ajutorul unui colorant, specific pentru citoplasmă, aşa cum este fucsina bazică, diferit de violetul de metil.

b. Coloraţia Ziehl-Neelsen

Principiul metodei - această coloraţie este folosită pentru colorarea bacteriilor alcoolo-acidorezistente (bacilul tuberculozei, bacilul leprei). Aceste microorganisme, datorită structurii lor deosebite, se colorează greu prin metodele obişnute de colorare. Ele rezistă la decolorarea cu acizi minerali diluaţi şi alcooli, iar această proprietate este legată de prezenţa în corpul şi învelişul microbian a unei substanţe ceroase din grupa alcoolilor superiori, numită micol care nu permite difuziunea şi absorbţia colorantului decât la cald şi cu soluţii concentrate fenicate.

BCU IASI

Material necesar:

- fucsină fenicată Ziehl;
- acid azotic diluat 1/3 sau acid sulfuric diluat 1/5;
- alcool 96°;
- albastru de metilen.

Tehnica coloraţiei Ziehl-Neelsen. Coloraţia cuprinde 3 timpi:

- Colorarea - frotiul uscat şi fixat se aşază pe un suport metalic şi se acoperă cu fucsină fenicată Ziehl, încălzindu-se uşor dedesubt până la emitere de vapori (fără a ajunge la fierbere), timp de 10 minute. În acest timp preparatul trebuie să fie în permanenţă acoperit cu soluţie colorantă. Dacă prin evaporare cantitatea de colorant scade, aceasta se înlocuieşte imediat pentru a nu se degrada preparatul. Se varsă apoi colorantul iar lama se spală cu apă de robinet.

- Decolorarea - se face cu soluţie de acid azotic 1/3 şi acid sulfuric 1/5 care se ţine timp de 2 minute apoi preparatul se spală cu apă de robinet. Decolorarea se continuă cu alcool de 96° până la îndepărtarea completă a colorantului. Frotiul trebuie să aibă un aspect alb-roziu după spălarea cu apă care opreşte şi acţiunea decolorantă a alcoolului.

- Recolorarea - se face cu o soluţie hidro-alcoolică fenicată de albastru de metil timp de 1-2 minute, după care preparatul se spală cu apă, se usucă şi se examinează la imersie.

BCU IASI - UNIVERSITY LIBRARY

5.2.3. Coloraţii speciale

• Aceste metode sunt folosite pentru a pune în evidenţă unele elemente structurale ale bacteriilor care nu pot fi observate prin metode obişnuite: sporul bacterian, capsula, peretele celular, incluziunile citoplasmatice.

5.2.3.1. Colorarea sporilor bacterieni

La unele bacterii, forma vegetativă, adică forma de creştere şi multiplicare, se poate transforma într-un spor; acestea se numesc bacterii sporogene.

Sporii sunt întâlniţi în special la bacili, mai rar la vibrioni şi spirili şi în mod excepţional la coci.

Forma sporilor este rotundă sau ovală. Poziţia lor în celula bacteriană este variabilă, constituind un criteriu de identificare şi clasificare. Astfel sporul ocupă o poziţie centrală la *Bacillus anthracis*, subterminală la *Bacillus cereus* şi terminală la *Clostridium tetani*. La *Bacillus subtilis* se întâlnesc toate cele trei poziţii ale sporului (Fig. 19).

Diametrul sporului poate fi mai mic sau mai mare decât diametrul transversal al celulei bacteriene. După acest criteriu sporii pot fi:

♦ **spori nedeformanţi** - al căror diametru transversal nu depăşeşte pe cel al celulei. Se întâlnesc la familia *Bacillaceae: Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus anthracis*;

♦ **spori deformanţi** - al căror diametru fiind mai

mare decât al celulei, deformează celula bacteriană. Se întâlnesc la genul *Clostridium*.

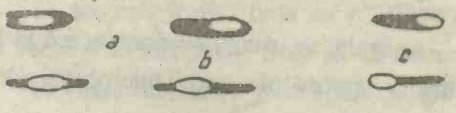


Fig. 19. Dispoziţia sporilor în celula bacteriană: a) central; b) subterminal; c) terminal.

Sporul bacterian poate fi pus în evidenţă fie printr-o coloraţie obişnuită (ex. coloraţia Gram) în care caz acesta apare ca o formaţiune refringentă, înconjurată de o membrană groasă, fie prin metode de colorare speciale pentru spori. Una din aceste metode este coloraţia sporilor cu verde malachit.

Tehnica coloraţiei:

- lamele fixate prin căldură se acoperă cu o soluţie apoasă de verde malachit 5%;
- se încălzeşte până la emiterea de vapori, se lasă să se răcească frotiul şi se îndepărtează colorantul (operaţia se repetă de trei ori, adăugând colorant proaspăt înainte de fiecare încălzire);
- se lasă să se răcească lama;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- se spală cu apă de robinet;
- se colorează timp de 30 secunde cu fucsină diluată 1/10;
- se spală, se usucă, se examinează la imersie.

La examenul microscopic, corpii microbieni vor apare colorați în roşu iar sporii în verde.

Colorarea sporilor se poate efectua şi prin metoda Pooman:

- frotiul fixat se acoperă cu fucsină Ziehl şi se încălzeşte de 2-3 ori până la apariţia de vapori;
- se decolorează cu acid sulfuric 1‰ şi se spală cu apă;
- se recolorează cu albastru de metilen Löffler timp de 2 minute, se spală cu apă şi se usucă.

La examenul microscopic sporii apar colorați în roşu iar celulele bacteriene în albastru.

5.2.3.2. Colorarea capsulei

Unele bacterii patogene şi saprofite au proprietatea de a produce la exteriorul peretelui celular, în anumite condiţii de viaţă, acumulări de substanţe de natură mucoidă cu greutate moleculară mare. Această formaţiune care constituie un înveliş, o teacă a celulei bacteriene, a fost denumită capsulă.

Punerea în evidenţă a capsulei se face fie prin colorații obişnuite (coloraţia Gram) când apare ca o zonă necolorată refringentă, luminoasă în jurul celulei bacteriene, fie prin colorații speciale. Dintre colorațiile speciale pentru capsulă amintim coloraţia cu albastru

de metilen alcalin Löffler şi coloraţia simplă cu albastru de toluidină.

Coloraţia cu albastru de metilen alcalin Löffler:

- se acoperă frotiul fixat cu o soluţie de albastru de metilen Löffler vechi şi se lasă astfel timp de 15 minute;
- se varsă colorantul şi se spală cu apă de robinet, se usucă şi se observă la microscop cu obiectivul cu imersie.

Dat fiind structura deosebită a capsulei faţă de cea a corpului microbian, aceasta se va colora deosebit, metacromatic. Capsula va apare colorată în roz, în timp ce corpul microbian se va colora în albastru.

Coloraţia cu albastru de toluidină:

- frotiul fixat se acoperă cu o soluţie de albastru de toluidină care se lasă pe lamă timp de 1-2 minute;
- se varsă colorantul, se spală, se usucă şi se examinează cu imersie.

Capsula apare colorată în roz, iar corpul bacterian în albastru.

5.2.3.3. Colorarea cililor bacterieni

Cilii sau flagelii sunt formaţiuni filamentoase lungi şi subţiri, flexibile şi fragile care constituie organite de locomoţie.

Cilii sunt prezenţi la majoritatea spirililor şi vibrionilor şi la aproape jumătate din bacili; excepţional cilii se pot întâlni la coci.

Evidenţierea mobilităţii bacteriilor poate fi efectuată prin metode directe şi prin metode indirecte (descrise la caracterele

morfologice şi tinctoriale).

Metode directe (colorare)

Cilii fiind foarte subţiri şi având afinitate scăzută pentru diverşi coloranţi nu sunt vizibili în preparatele colorate în mod obişnuit. De aceea, pentru evidenţierea lor, cilii se mordansează; mordantul se depune pe suprafaţa cililor şi în acest fel le măreşte diametrul şi afinitatea.

Preparatele se execută pe lame de sticlă noi, subţiri, foarte curate şi degresate. În acest scop lamele se ţin în prealabil 7 zile în amestec oxidant sulfo-cromic.

Culturile din care se execută preparatele trebuie să fie tinere (18-20 ore), crescute pe geloză simplă, în tuburi înclinate. Suspensia bacteriană se prepară cu grijă, recoltând din lichidul de condensare de la capătul tubului o cantitate mică de cultură care se introduce în 1-3 ml apă distilată sterilă. Suspensia se lasă 30 minute la temperatura camerei. Se depune apoi o picătură recoltată cu multă grijă pe unul din capatele lamei, în prealabil flambată şi răcită. Se înclină lama cu grijă până ce picătura traversează lungimea ei şi apoi se usucă la aer.

Acest mod de pregătire a preparatelor este valabil pentru oricare din metodele de colorare utilizate.

Metoda Bailey (modificată de Fischer şi Conn)

Material necesar:

- soluţia A - mordant fier-tanin;
- soluţia B - substanţă colorantă;

- soluţie fucsină Ziehl.

Prepararea soluţiilor este prezentată în Anexă.

Tehnica de lucru:

Pe preparatul executat prin metoda descrisă mai sus, se filtrează soluţia A (pe lamă) şi se lasă timp de 3-5 minute fără încălzire. Se varsă soluţia A şi fără a se spăla cu apă se adaugă soluţia B, de asemenea filtrată direct pe lamă. Aceasta se ţine pe lamă timp de 7 minute. Apoi preparatul se spală cu apă distilată. Se acoperă apoi cu fucsină şi se ţine un minut, timp în care se execută o uşoară încălzire (până la prima emitere de vapori). Preparatul se spală apoi cu apă de robinet, se usucă la aer şi se examinează la microscop la obiectivul cu imersie. Celulele şi cilii se colorează în roşu.

Metoda Leifson

Material necesar:

- fucsină bazică (soluţie 1,2% în alcool etilic 95%);
- soluţie acid tanic (3% în apă distilată);
- soluţie NaCl 1,5%.

Soluţia stoc se face amestecând cantităţi egale din cele trei soluţii şi se păstrează la frigider.

Tehnica de lucru:

Se acoperă frotiul cu 1 ml din soluţia colorantă şi se lasă 5-15 minute (depinde de vechimea soluţiei şi temperatura laboratorului). În acest timp se formează precipitate din cauza evaporării alcoolului.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

Când precipitatele îşi schimbă culoarea, colorantul se îndepărtează prin spălare. După spălare, se usucă la aer şi se examinează la microscop la obiectivul cu imersie. Cilii se colorează în roz sau roşu şi corpul bacterian poate fi necolorat sau colorat în roz pal.

5.2.3.4. Colorarea peretelui celular

Bacteriile prezintă un perete celular rigid care este uşor observabil la microscopul electronic. La microscoapele optice obişnuite acest lucru este posibil numai dacă se face o colorare specială.

Material necesar:

- culturi de 24 ore de *Escherichia coli* şi *Bacillus cereus* pe agar nutritiv;
- clorură de cetylpyrimidină M/100, soluţie apoasă saturată de roşu Congo şi de albastru de metilen.

Tehnica de lucru:

- se prepară frotiuri din cele două culturi de bacterii care se fixează prin căldură;
- se adaugă trei picături din soluţia de cetylpyrimidină pe fiecare frotiu;
- se adaugă o picătură de roşu Congo pe fiecare frotiu şi se amestecă picăturile cu ansa fără a se atinge frotiul;
- se roteşte uşor lama dând o mişcare picăturilor de deasupra fiecărui frotiu;

- se înlătură colorantul cu apă;

- se recolorează timp de 10 secunde cu albastru de metilen;

- se înlătură colorantul şi se usucă lama.

Observarea preparatului se face la obiectivul cu imersie.

În cazul când nu avem clorură de cetylpyrimidină se poate folosi următoarea metodă:

- frotiul se fixează cu formaldehidă 5% timp de 5 minute sau la flacără;

- colorarea frotiului cu alcian blue 0,5% sau 1% (pH = 2,5-3 ajustat cu acid acetic) timp de 1 minut;

- spălarea frotiului cu apă de robinet timp de 3 minute;

- colorarea cu safranină (soluţie apoasă 1%) timp de 10 secunde;

- spălarea cu apă, uscarea şi observarea la microscop.

Peretele celular apare colorat în albastru închis, iar citoplasma în roşu.

5.2.3.5. Colorarea nucleului

Metoda Robinov

Se execută un frotiu dintr-o cultură de ***Bacillus subtilis***. Frotiul se fixează cu ajutorul vaporilor de acid osmic şi apoi cu alcool de 90°. După fixare, frotiul este supus unui proces de hidroliză într-o baie de acid clorhidric 1 N, timp de 2-20 minute, la temperatura de 60°C. Se spală apoi lama într-o baie cu apă de robinet, schimbându-se apa de două ori. În continuare, frotiul se colorează cu soluţie Giemsa

1/20, timp de 30 secunde (prepararea soluției Giemsa este dată în Anexă). Lama se spală apoi cu apă de robinet, se usucă și se examinează la microscop.

Citoplasma apare colorată în roz iar elementele nucleare în roșu-violaceu.

5.2.3.6. Colorarea incluziunilor citoplasmatice

Prin incluziuni se înțeleg, de obicei, substanțe inerte depuse în citoplasma celulei. După natura lor aceste incluziuni sunt de mai multe feluri:

a) **Incluziuni de volutină** - au fost descoperite de V. BABEȘ în 1887 la *Corynebacterium diphtheriae* și *Mycobacterium tuberculosis* și apoi de ERNST în 1889 la alte specii și alge cianoficee (*Cyanobacterii*). Denumirea de granulații de volutină a fost dată de GRIMM datorită faptului că se întâlnesc în număr foarte mare la *Spirillum volutans*. Adesea, în literatură sunt denumite granulațiile Babeș-Ernst. Incluziunile de volutină sunt caracteristice pentru genurile *Corynebacterium*, *Spirillum* și *Azotobacter*. Au o formă sferică cu diametrul de câteva sute de Å până la 0,5 microni.

Incluziunile de volutină se pot pune în evidență prin colorații speciale. Dintre acestea amintim coloratia Neisser.

Tehnica colorației

Frotiul uscat și fixat prin căldură se colorează cu colorantul Neisser timp de 1-2 minute. Se spală, se tratează cu soluție Lugol lactat timp de 10-30 minute (soluție Lugol 100 ml + 1 ml acid acetic

concentrat sau acid lactic); se spală şi se colorează timp de 15 secunde preparatul cu crizoidină soluţie 1% sau vezuvină 0,2%. Preparatul astfel colorat se spală, se usucă, se examinează la imersie. Corpul bacterian apare colorat în galben-brun iar corpusculii metacromatici în albastru.

b) Incluziuni de glicogen

Aceste incluziuni se colorează în brun cu soluţie Lugol. Ele pot fi uşor puse în evidenţă la *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter* şi la levuri. La aceste specii se constată că pe măsură ce celulele îmbătrânesc, numărul incluziunilor de glicogen creşte. Se pare că au rol de sursă de energie.

Pentru punerea în evidenţă a incluziunilor de glicogen la drojdii se execută preparate între lamă şi lamelă în care se pune o picătură de soluţie Lugol concentrat. Se lasă 5-10 minute, apoi se examinează la obiectivul cu imersie. Celulele vor apare colorate în galben iar incluziunile se vor colora în brun închis.

6. METODE DE MICROSCOPIE UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIE

Datorită dimensiunilor lor extrem de mici, microorganismele nu au putut fi observate şi descrise decât o dată cu descoperirea unor sisteme optice capabile să le facă vizibile printr-o mărire suficientă a imaginii lor.

Dacă primele încercări de combinare a lentilelor sunt de dată foarte veche (ROGER BACON, secolul al XIII-lea şi GALILEU,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

secolul al XVI-lea), descoperirea microscopului şi descrierea primelor microorganisme se datoresc lui ANTONY VAN LEEUWENHOEK (1683).

Tot în secolul al XVII-lea ROBERT HOOKE aduce microscopului prima perfecţionare importantă, care constă în introducerea iluminării artificiale a obiectului şi concentrarea luminii cu ajutorul unui sistem optic.

În secolul al XIX-lea şi mai ales în secolul al XX-lea, odată cu dezvoltarea tehnicii, s-au construit numeroase tipuri de microscoape, din ce în ce mai perfecţionate, ceea ce a reprezentat unul dintre factorii determinanţi ai acumulării cunoştinţelor actuale asupra microorganismelor.

Înţelegerea principiilor care stau la baza construirii diferitelor tipuri de microscoape, a modului de formare a imaginii şi în ultima instanţă a posibilităţilor, limitelor şi a modului de folosire cu maximă eficienţă a fiecărui tip, necesită recapitularea câtorva probleme referitoare la proprietăţile radiaţiilor şi a câtorva noţiuni elementare de optică microscopică.

6.1. MICROSCOPUL FOTONIC CU FOND CLAR

Microscopul este un instrument optic special construit cu scopul de a mări şi prin aceasta de a permite observarea obiectelor foarte mici şi pentru a *"rezolva"* detaliile fine ale preparatului, permiţând astfel evidenţierea unor amănunte de structură fine şi apropiate. El îndeplineşte acest dublu scop datorită faptului că formează o imagine mărită a obiectului, perceptibilă pentu ochi, şi că

are o putere de rezoluţie (de separare vizuală) mult mai mare decât a ochiului liber.

Microscopul fotonic este un instrument complex în care toate părţile componente formează un ansamblu unitar care concură la realizarea unei imagini cât mai bune a unui preparat. El este alcătuit dintr-o parte mecanică (piciorul microscopului, platina cu sistemele ei de deplasare în plan orizontal şi tubul microscopic care poate fi deplasat în sus şi în jos, prin intermediul unor angrenaje - vizele micro- şi macrometrică) şi o parte optică, formată din sistemul de iluminare şi sistemul optic propriu-zis (obiectivele şi ocularele).

Teoria modernă a luminii este complexă şi însumează deopotrivă teoria undelor electromagnetice şi teoria corpusculară a fotonilor.

În acord cu teoria ondulatorie sau a undelor, lumina este transmisă de la un corp luminos la ochi sau la alte obiecte printr-o mişcare vibratorie. Transportul energiei sub formă de unde nu implică însă translocarea mediului prin care se propagă undele (în cazul luminii nu implică mişcarea, deplasarea aerului).

Spectrul vizibil utilizat de microscopul fotonic formează numai o mică parte dintr-un spectru mai larg de radiaţii electromagnetice şi corespunde limitelor între care sensibilitatea biologică a ochiului poate înregistra imaginile furnizate. El este cuprins între 400-700 nm (respectiv 4000-7000 Å) şi poate fi divizat în funcţie de lungimea de undă care determină culoarea radiaţiilor în mai multe zone:

- violet (400 nm), albastru (400-500 nm);
- albastru-verde (500 nm), verde (500-600 nm);
- galben (600 nm), galben-portocaliu (600-700 nm).

BCU IASI

roşu (700 nm).

Celelalte zone ale spectrului, invizibile pentru ochi pot fi folosite în microscopie, cu condiţia introducerii în sistemul optic a unui dispozitiv menit să "genereze" lungimi de undă situate în zona vizibilă, ca de exemplu placa fotografică pentru radiaţiile ultraviolete sau ecranul fluorescent pentru microscopul electronic.

Părţile componente ale microscopului

Partea mecanică

"Piciorul" sau "baza" microscopului fotonic care susţine întregul aparat este reprezentat de un suport metalic greu, în formă de V sau U la modelele clasice, sau de formă rectangulară, având încorporat sistemul de iluminare, la cele moderne. Pe placa bazală este articulat sau solid legat prin construcţie, corpul microscopului propriu-zis. La microscoapele moderne, tendinţa constructorilor este aceea de a concentra toate dispozitivele de comandă spre baza stativului, astfel încât mâna observatorului execută mişcări limitate, evitând oboseala. Tubul care lega ocularul şi obiectivele la microscoapele clasice a fost păstrat la microscoapele monoculare şi a dispărut practic la microscoapele moderne binoculare.

Revolverul este un dispozitiv prevăzut cu un sistem fin de centrare care permite substituirea prin rotaţie a 4 obiective, cu puteri de mărire diferite, asigurând centrarea riguroasă a obiectivului în axul microscopului.

Platina microscopului, rotundă la modelele mai vechi, pătrată la cele moderne este echipată din construcţie cu un "cărucior" care

fixează preparatul şi permite deplasarea lui - în plan orizontal - lateral (stânga ⇄ dreapta) şi înainte ⇄ înapoi. Poziţia preparatului în cursul acestor deplasări poate fi controlată cu ajutorul a 2 verniere, corespunzând celor 2 direcţii de deplasare. Indicaţiile furnizate de cifrele de pe cele 2 verniere sunt folosite curent pentru a preciza şi repera relativ uşor localizarea unei zone interesante din preparat.

Sistemul de punere la punct care asigură deplasarea în sus şi în jos a tubului microscopului include două dispozitive dintre care primul relativ rapid, pus în mişcare cu ajutorul vizei macrometrice este folosit pentru punerea la punct cu obiective slabe, pentru ridicarea tubului în vederea schimbării sau curăţirii obiectivelor sau pentru punerea la punct cu aproximaţie, în cazul utilizării obiectivelor cu putere mare de mărire.

Cel de al doilea mult mai lent, asigură punerea la punct de finețe şi este pus în mişcare cu ajutorul vizei micrometrice.

Partea optică

Partea optică a microscopului este constituită din 2 sisteme: sistemul de iluminare şi sistemul optic propriu-zis.

Sistemul de iluminare. În afară de calităţile sistemului optic ca atare, claritatea imaginii este influenţată de iluminarea preparatului. Pentru a obţine o imagine de înaltă calitate optică este necesară o sursă de lumină suficient de puternică şi omogenă şi o diafragmă de câmp, care să permită limitarea câmpului iluminat la câmpul observat.

Sursa de lumină folosită de microscopul fotonic obişnuit este reprezentată de energia radiantă luminoasă (fotonii) a spectrului vizibil, cu o lungime de undă cuprinsă între 400-700 nm, furnizată de

lumina solară sau de un bec electric. Pentru microscopul binocular la care din cauza absorbţiei produsă de prismă, cantitatea de lumină care ajunge în fiecare tub este de numai aproximativ 1/3 din cea primită de tubul microscopului monocular.

Luminozitatea este reglată cu ajutorul oglinzii plan-concave a condensatorului, a diafragmei iris şi a filtrelor de lumină.

Oglinda (cu o faţă plană şi una concavă) reflectă în condensator razele de lumină emise de sursă, sub forma unui con luminos, cu o deschidere mai mult sau mai puţin întinsă. Pentru preparatele colorate (frotiuri cu microorganisme), care se observă cu obiectivul de imersie, sau pentru suprafeţele care se examinează cu obiectivele uscate, se utilizează oglinda plană, ori de câte ori sursa de lumină artificială este suficient de puternică şi depărtată sau dacă se foloseşte lumina naturală.

Utilizarea oglinzii concave pentru o sursă bună de lumină produce deformări ale fasciculului luminos, care nu mai poate fi controlat în mod adecvat. De aceea, ea trebuie să se limiteze la cazul în care sursa de lumină este foarte slabă şi apropiată.

*Condensatorul Abbe** concentrează razele de lumină paralele, reflectate de oglindă, sub forma unui con de raze oblice care converg într-un focar situat pe obiectul de cercetat (la nivelul lamei de

---

* *Unii autori au propus înlocuirea termenului de condensator folosit curent în literatura franceză, cu acela de condensor* pentru a evita exprimarea ambiguă datorită existenţei condensatorilor electrici. Propunerea este nejustificată deoarece condensatorii electrici nu sunt folosiţi în microscopia fotonică, iar termenul de *condensor* are echivalentul la maşinile cu aburi. Autorul primului condensator optic, DUJARDIN (1843) l-a numit *"concentrator"*.

microscop), pe care-l luminează uniform.

Diafragma iris controlează unghiul luminii care trece prin condensator. În general, dacă se foloseşte un obiectiv cu apertură numerică mare şi diafragma este parţial închisă, claritatea imaginii este mult îmbunătăţită.

Filtrele de lumină întăresc detaliile imaginii preparatului (le fac mai nete) şi fac examinarea mai puţin obositoare. Se folosesc frecvent filtre de sticlă mată sau opacă, care au dezavantajul unei structuri granulare şi de a absorbi o cantitate importantă de lumină sau filtre de sticlă colorată.

Utilizarea filtrelor are la bază următorul principiu: datorită aşezării atomilor în molecula lor, anumite substanţe chimice au proprietatea de a absorbi razele luminoase cu o anumită lungime de undă (λ) permiţând propagarea altora. În felul acesta o substanţă care lasă să treacă numai radiaţii cu λ = 500-600 nm, oprind restul radiaţiilor din lumina albă incidentă, va apare colorată în verde.

În mod similar, obiectul care reflectă numai radiaţii cu o lungime de undă restrânsă va apare colorat în culoarea corespunzătoare razelor reflectate (lungimea de undă determină culoarea radiaţiilor în spectrul vizibil).

Datorită acestui fapt, un obiect care este capabil să transmită sau să reflecte numai lungimea de undă de 400-500 nm (albastru), când este iluminat cu radiaţii care nu conţin nici o lungime de undă mai mare de 650 nm va apare negru.

La microscoapele moderne de tip Lumipan Zeiss sistemul de iluminare, încorporat în baza (talpa) microscopului este prevăzut cu un sistem special (pancratic) pentru controlul fluxului de lumină. Cu

ajutorul sistemului pancratic apertura condensatorului poate fi schimbată după voie, într-o scară largă, ceea ce permite adaptarea sursei de lumină la cerinţele de iluminare ale obiectivelor. Deasupra sistemului pancratic este un grup de 3 condensatoare, care pot fi schimbate cu uşurinţă între ele, printr-o mişcare de rotaţie.

Ocularul microscopului este un sistem optic, având forma unui mic cilindru, care se introduce în partea superioară a tubului microscopului (înspre ochiul observatorului) şi care are rolul de a mări imaginea dată de obiectiv, de a corecta unele defecte ale obiectivului şi în cazuri speciale de a proiecta imaginea unui fir indicator sau a unei scale, localizate în interiorul său. Ocularele sunt compuse din două lentile, simple sau compuse, montate la cele două extremităţi ale unui cilindru, dintre care cele aşezate în partea superioară (înspre ochi) au rol de mărire, iar cele aşezate în partea opusă reprezintă lentila (sau lentilele) de câmp.

Ocularele sunt împărţite convenţional în două categorii:

1. Oculare care servesc pentru observarea directă (cu ochiul) şi care dau o imagine la infinit pentru un observator care are ochiul normal;

2. Oculare care formează o imagine reală, la o distanţă mică, fie pe un ecran, fie pe o placă fotografică.

Cu cât ocularul este mai puternic imaginea pierde din claritate şi din întindere, conturul obiectelor observate devine mai puţin net, fără ca puterea de rezoluţie să crească. De aceea se recomandă ca pentru activitatea curentă să se folosească un obiectiv puternic şi oculare cu putere de mărire mică sau mijlocie.

Obiectivul microscopului este un sistem optic constituit dintr-o

serie de lentile dispuse într-un tub cilindric, înşurubat cu partea superioară în "revolverul" schimbător de obiective, destinat să funcţioneze în imediata apropiere a obiectului de examinat.

Caracteristicile principale ale obiectivelor sunt reprezentate de:

a) deschiderea numerică - care exprimă unghiul maxim sub care razele care ies direct pot pătrunde în interiorul sistemului optic;

b) puterea de mărire gravată pe obiectiv - ex 100x - care exprimă mărirea pe care obiectivul o introduce în sistemul optic respectiv;

c) gradul de corecţie al aberaţiei cromatice.

În funcţie de această ultimă caracteristică există patru tipuri de obiective:

1) obiective monocromatice care dau o imagine corectă numai pentru o lungime de undă a spectrului;

2) obiective acromatice care teoretic corectează imaginea pe toată întinderea spectrului, dar practic dau o imagine bine corectată de aberaţiile cromatice numai pentru lungimile de undă (λ) de maximă sensibilitate a ochiului (de la galben la verde). Corecţia este cu atât mai puţin bună cu cât se depărtează de aceste zone;

3) obiectivele semiapocromatice foarte utilizate în practică, au rolul de a corecta aberaţiile cromatice în zona cuprinsă de la roşu la albastru;

4) obiectivele apocromatice, a căror corecţie se întinde efectiv pe tot spectrul vizibil, sunt cele mai perfecţionate, alcătuite uneori din 12 lentile, dau o corecţie aproape completă aberaţiei de culoare şi sunt caracterizate printr-o foarte mare strălucire

şi claritate a imaginii ca şi prin puterea maximă de rezoluţie, datorită folosirii lor la producerea fluoritului mineral.

Obiectivele "uscate" sunt obiective la care mediul interpus între lentila lor frontală şi preparat este aerul (Fig. 20). Datorită indicelui de refracţie (n) diferit (aer n = 1, sticlă n = 1,5) razele luminoase care provin din obiect, dacă sunt suficient de oblice, suferă refracţia sau chiar reflexia totală la limita de separare lamă-aer.

Unghiul limită care determină reflexia totală nu permite ca deschiderea numerică să fie mai mare ca 1.

În consecinţă, aceste obiective au o putere de mărire mai slabă, deoarece mărirea utilă e proporţională cu deschiderea numerică.

Obiectivele "cu imersie" (Fig. 20) se numesc astfel deoarece se folosesc interpunând între lentila lor frontală şi preparat, un ulei de imersie având un indice de refracţie (n), apropiat de al sticlei (n = 1,5). Cel mai folosit în practică este uleiul de cedru având n = 1,51 (balsamul de Canada are n = 1,53, iar uleiul de parafină 1,47).

Necesitatea folosirii obiectivelor cu imersie decurge din faptul că atunci când o rază oblică trece dintr-un mediu dens (lama de sticlă), într-un mediu mai puţin dens (aerul), ea este refractată sub un unghi mare faţă de normală, care nu-i permite să pătrundă în lentila obiectiv.

BCU IASI CENTRAL LIBRARY

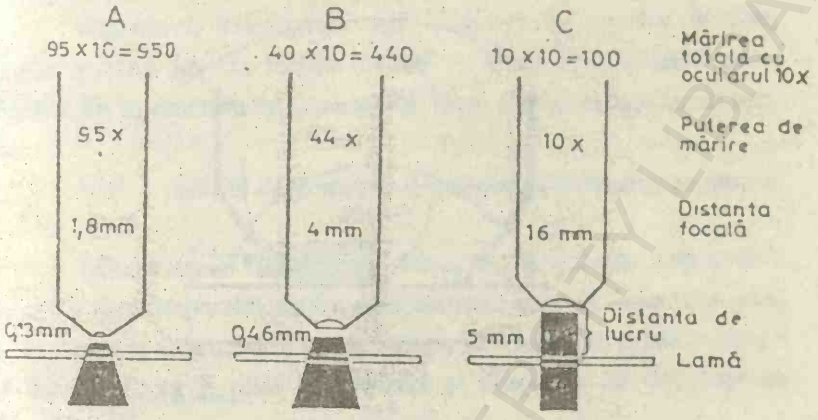


Fig. 20. Obiectivele folosite în microscopia optică: A = obiectivul cu imersie; B şi C = obiective uscate. Distanţa de lucru a obiectivului este cu atât mai mare, cu cât puterea sa de mărire este mai mică.

Acest fenomen datorită căruia razele mai laterale nu mai pot intra în obiectiv (obiectivele puternice având lentila frontală foarte mică) diminuează nu numai luminozitatea imaginii - care depinde de cantitatea de lumină pătrunsă în obiectiv - ci şi claritatea ei, deoarece puterea de rezoluţie este în funcţie de apertura efectivă a obiectivului. În prezenţa uleiului de cedru - care are acelaşi indice de refractie ca şi sticla - razele de lumină nu se mai refractă, ci îşi urmează drumul lor normal, intrând în totalitate în obiectiv (Fig. 21).

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

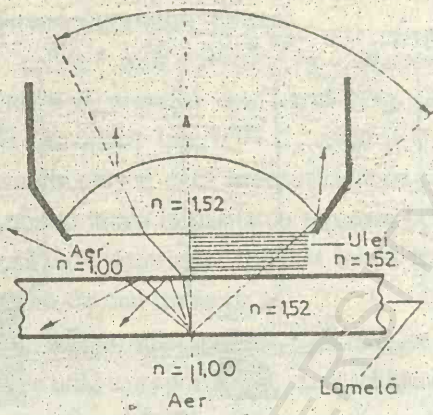


Fig. 21. Funcţia uleiului folosit la obiectivul cu imersie. Indicele de refracţie (n) al lamei de sticlă şi al uleiului este acelaşi, ceea ce face ca o cantitate mare de raze să pătrundă în lentila obiectiv. În absenţa uleiului de imersie, la ieşirea din lama de sticlă razele sunt refractate sub un unghi mare şi nu vor mai intra în lentila obiectiv.

Precauţii. Înainte de a folosi obiectivul de imersie se reglează lumina cu ajutorul unui obiectiv slab. Apoi se coboară rapid, cu ajutorul vizei macrometrice, tubul microscopului, până când lentila frontală a obiectivului vine în contact cu picătura de ulei care trebuie să fie convexă (nu etalată). Se ridică uşor tubul, fără a pierde contactul cu uleiul de cedru, după care - privind prin ocular - este coborât lent până apare o imagine neclară, după care se pune la punct, până se vede clar, cu ajutorul vizei micrometrice. La sfârşitul

examenului, obiectivul este ridicat din ulei şi curăţat.

Obiectivele telescopice sunt obiective cu imersie la care, pentru a evita lovirea lentilei frontale, cilindrul port-lentilă poate aluneca lin în montura microscopului, unde este menţinut de un arc.

Modul de formarea a imaginii la microscopul fotonic

Microscopul fotonic este bazat pe modulaţia amplitudinii pentru a face preparatul vizibil dacă anumite zone de obiectul studiat au capacitatea de a absorbi razele luminoase în diferite grade, detaliile de structură pot fi puse în evidenţă şi observate ca diferenţe de intensitate.

Modulaţia de amplitudine se produce mai greu sau deloc în preparatele foarte subţiri, deoarece capacitatea unui obiect de a absorbi lumina scade rapid pe măsură ce grosimea sa diminuează. În aceste cazuri, pentru a contracara reducerea puterii de absorbţie (creşterea transparenţei) care este foarte marcată la dimensiuni microscopice, se recurge la colorarea preparatului.

Imaginea dată de microscopul fotonic (cu câmp clar) este o imagine de interferenţă între razele directe şi cele difractate de obiect. Obiectul dă, în partea superioară a tubului microscopului, o imagine reală, răsturnată şi mărită a obiectului. Ocularul, care acţionează ca o lupă, preia această imagine şi o transformă într-o imagine virtuală, dreaptă şi mărită în raport cu prima imagine. În felul acesta, imaginea finală dată de microscopul fotonic este virtuală, răsturnată şi mult mărită în raport cu obiectul.

Mărirea finală dată de microscop depinde de lungimea focală

a obiectivului, de puterea de mărire a ocularului şi de distanţa dintre sistemul de lentile al obiectivului şi imaginea produsă, adică de lungimea optică a tubului.

Practic vorbind, mărirea totală a unei imagini de către microscop poate fi variată prin schimbarea obiectivelor şi ocularelor şi este egală cu produsul dintre puterea de mărire parţială a obiectivului şi cea a ocularului (de ex. obiectivul 40, ocularul 10 x = mărire x 400; obiectivul 40, ocularul 15 x = mărire x 600). Aceste valori sunt realizabile cu condiţia ca lungimea mecanică a tubului (distanţa între imaginea superioară a lentilei port-ocular şi partea cu filet a monturii obiectivului) să fie de 160 mm, aşa cum este la microscoapele moderne.

În mod obişnuit, când mărirea este de 500 ori mai mare decât apertura numerică a obiectivului, ochiul este capabil să perceapă toate detaliile de structură. Limita superioară a măririi eficiente se atinge atunci când ea este de 1000 ori mai mare ca AN a obiectivului folosit. De exemplu, pentru obiectivul 40, cu AN = 0,65, mărirea maximă totală este de 600 diametre (obţinută prin combinarea obiectivului 40 x cu ocularul 15 x).

Nu este indicată folosirea în observaţie a unor oculare cu mărire foarte puternică, deoarece rolul ocularului este mai curând de a face observabilă rezoluţia obiectivului şi de a o mări. De obicei, mărirea maximă atinsă cu cele mai bune sisteme optice este de 1350 x (obiectiv 90, ocular 15).

La microscopul binocular, razele de lumină de la obiectiv sunt împărţite de o suprafaţă semiargintată, înclinată la 45°, în aşa fel încât jumătate din lumină trece vertical, iar restul este reflectată orizontal.

Fiecare din aceste jumătăţi din cantitatea totală de raze este dirijată în ocularul respectiv prin intermediul unei prisme care amplifică imaginea de 1,5 x. Datorită acestui fapt, la microscopul binocular se recomandă utilizarea unor oculare mai slabe (6 x sau 8 x), cele mai puternice (10 x, 15 x) dând imagini neclare, ca urmare a unei măriri excesive în raport cu apertura obiectivului.

6.2. MICROSCOPUL CU FOND NEGRU
(cu câmp întunecat)

În stare vie, microorganismele foarte transparente şi de dimensiuni extrem de mici nu dau imagini în microscopul obişnuit sau dau cel mult imagini greu de interpretat.

Microscopul cu câmp negru (cu lumină indirectă) măreşte foarte mult contrastul imaginii prin folosirea unui dispozitiv de iluminare laterală a preparatului datorită căruia câmpul microscopic, neprimind lumină directă rămâne negru, pe când particulele-obiect, luminate, apar strălucitoare. Deci, spre deosebire de microscopul cu câmp clar, în care razele emise de sursa lumintă pătrund direct în aparat după ce au străbătut obiectul, în microscopul cu fond negru razele luminoase pătrund numai indirect, după ce au fost reflectate, refractate sau difractate de obiect. În felul acesta obiectul de examinat devine o sursă secundară de lumină şi apare ca şi cum ar lumina el însuşi pe un fond întunecat.

Principiul acestui microscop constă în utilizarea unui fenomen observat curent în natură (fenomenul Tyndall) şi anume: particule foarte mici de pulberi existente în aer, invizibile la lumina directă din

cauza dimensiunilor lor, devin vizibile cu ochiul liber atunci când se găsesc în drumul lor raze de lumină care pătrund într-o cameră întunecată (de exemplu, cu acelea emise de proiectorul unui epidiascop sau al unui aparat cinematografic). În aceste condiţii, o particulă devine vizibilă - chiar când este foarte mică - dacă este capabilă să absoarbă şi să disperseze o cantitate suficientă de lumină. Când dimensiunile particulelor scad sub 200 nm, microscopul cu lumină indirectă pune în evidenţă numai ceea ce în fizică se numeşte o imagine de difracţie, fără nici o indicaţie asupra formei, mărimii sau structurii obiectivului (Fig. 22).

Microscopul cu fond negru diferă de cel obişnuit prin faptul că foloseşte un dispozitiv construit în aşa fel încât razele de lumină directă sunt oprite să intre în obiectiv iar preparatul este luminat numai de razele periferice care cad foarte oblic pe el. Acest lucru se realizează în practică fie cu ajutorul unor ecrane speciale de câmp întunecat, plasate sub condensator sau deasupra lui, fie folosind un condensator de tip special (cardioid sau paraboloid) care realizează acelaşi mod de iluminare. Din această cauză, în tubul microscopului şi la ochiul observatorului nu vor ajunge decât acele raze care sunt refractate sau difractate de particulele din câmp al căror indice de refracţie este diferit de acela al mediului în care sunt suspendate.

În aceste condiţii, în absenţa unui obiect, în obiectiv nu pătrunde lumină, iar câmpul microscopului apare negru. În mod similar, când obiectul este complet transparent şi omogen, ca şi în cazul în care obiectul are un diametru inferior puterii separatoare limită a microscopului respectiv, lumina dirijată prin condensator nu intră în obiectiv şi întreg câmpul este negru.

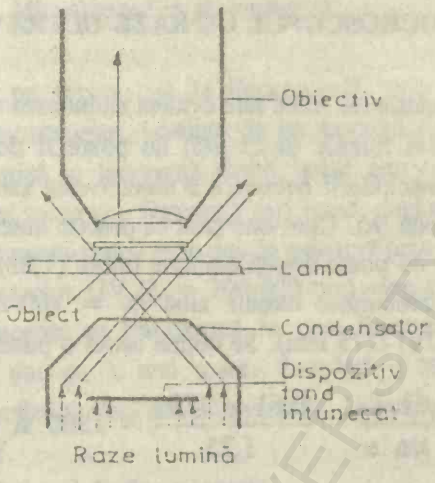


Fig. 22. Reprezentarea schematică a principiului de funcţionare a microscopului cu fond întunecat. În obiectiv pătrund numai razele de lumină care sunt deviate de obiectele existente în preparat.

În cazul în care mediul transparent conţine obiecte care diferă de el ca indice de refracţie, lumina proiectată pe suprafaţa lor sub un unghi ascuţit, va suferi un efect de dispersare prin reflexie şi refracţie şi va intra în obiectiv, dând o imagine luminoasă a obiectelor pe un câmp întunecat.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.3. MICROSCOPUL CU RAZE ULTRAVIOLETE

Din relaţia lui Abbé este evident că puterea separatoare limită a microscopului fotonic (0,25 μm) nu poate fi depăşită decât prin modificarea deschiderii numerice a obiectivelor sau prin diminuarea lungimii de undă (λ). Cum este ştiut că practic deschiderea numerică a obiectivelor nu poate depăşi anumite limite (1,25), microscopul cu fluorescenţă înlocuieşte lumina albă (λ = 400-700 nm), cu cea ultravioletă (UV) (275 mm). Se obţine astfel o putere separatoare:

$$d = \frac{0{,}61\ \lambda}{n \sin \alpha} = \frac{0{,}61\ x\ 2750}{1{,}25} = 1300\ \text{Å}\ (0{,}13\ \mu m)$$

În afară de aceasta, în timp ce constituienţii celulelor vii sunt transparenţi şi incolori pentru lumina albă, ei se comportă diferit faţă de radiaţii UV, pe care în funcţie de compoziţia lor chimică absorb în diferite grade, mărind contrastul imaginii şi permiţând evidenţierea şi localizarea chiar în celula vie, a unor structuri invizibile în lumina albă.

Microscopul cu raze UV foloseşte o optică specială permeabilă la UV (cuarţ sau sticlă de tip special) şi obiective corectate pentru lumina vizibilă necesare pentru punerea la punct. Întrucât ochiul omenesc nu este sensibil din punct de vedere optic la UV, imaginile obţinute sunt reproduse pe plăci fotografice sau proiectate pe un ecran de televiziune.

Microscopul UV are deci dezavantajul că nu permite examenul vizual direct al preparatelor.

Microscopul cu fluorescenţă

Se bazează pe fenomenul de fluorescenţă, prin care unele substanţe numite fluorescente, iradiate de un fascicul de raze cu o lungime de undă mică şi frecvenţă înaltă, emit alte radiaţii cu o lungime de undă mai mare şi o frecvenţă mai joasă, deci de o culoare diferită. Fenomenul poate fi mai bine pus în evidenţă prin folosirea ca sursă de lumină a razelor UV (λ = 300-400 nm) care sub influenţa substanţelor fluorescente se transformă în raze fluorescente (cu o energie mai mică dar cu λ mai mare, formând o imagine care impresionează placa fotografică sau este vizibilă, cu ochiul protejat de un filtru pentru UV.

Există două tipuri de fluorescenţă:

1) Fluorescenţa primară (autofluorescenţa, fluorescenţă naturală) - în care obiectele emit direct această lumină, sub influenţa fluxului excitator, datorită prezenţei în compoziţia lor a unor substanţe capabile de fluorescenţă (unii pigmenţi bacterieni, clorofile etc.).

2) Fluorescenţa secundară, mai intensă, nu este emisă direct de un obiect, ci numai după ce a fost impregnat cu substanţe speciale numite fluorocromi.

Fluorocromii cei mai folosiţi în microbiologie sunt auramina, acridina, rodamina B, tripaflavina, fluoresceina şi derivaţii ei. Culoarea fluorescentă dată de ei este variabilă (verde închis sau deschis, galben, portocaliu etc.).

În esenţă, fenomenul de fluorescenţă are următorul substrat: absorbind energia luminoasă care cade asupra lor, moleculele

substanţelor fluorescente ajung într-o stare de excitaţie moleculară, datorită trecerii electronilor din atomii lor la un nivel energetic superior, prin migrarea lor treptată, pe orbite situate mai departe de nucleu (mai în afară). Această stare a moleculelor este instabilă, astfel că ele revin spontan la un nivel energetic mai scăzut o parte din energia luminoasă fiind redată în mediul exterior, tot sub formă de radiaţii luminoase, dar cu o modificare a energiei şi a lungimii de undă. Fenomenul este însoţit de pierderea unei părţi din energia primită ("pierderile lui Stockes") datorită înlocuirii cuantelor de lumină absorbită cu cuante mai mici, de fluorescenţă. În urma pierderilor lui Stockes, radiaţia de lumină redată, fluorescenţa - este mai săracă din punct de vedere energetic decât radiaţia producătoare a fenomenului dar are o lungime de undă mai mare şi prin aceasta este deviată înspre porţiunea roşie a spectrului.

În felul acesta la microscopul cu fluorescenţă nu apar particule iluminate, ci particule care "luminează" ele însile, pe un fond închis.

Microscopia cu fluorescenţă se deosebeşte de microscopul UV, pentru că la acesta din urmă, razele UV invizibile pentru ochi, trec prin lentile optice speciale şi prin preparat, pentru a da, ca urmare a unor coeficienţi diferiţi de absorbţie, o imagine invizibilă pentru ochi, dar care poate fi înregistrată pe o placă fotografică.

Montarea microscopului cu fluorescenţă

Microscopul folosit în acest scop este un microscop fotonic obişnuit.

Sursa de lumină este o lampă cu arc voltaic sau cu vapori de Hg, bogată în raze UV. Această lampă emite raze cu diferite lungimi

de undă, dar cu prevalenţă mică şi cu frecvenţă înaltă. Pentru a le alege pe cele mai favorabile scopului, se foloseşte un sistem de iluminare special şi mai complicat, format din colector, obturator, cuvă, filtrele de lumină şi condensator.

Filtrele pentru lumina de excitaţie, confecţionate dintr-o sticlă specială (sticlă Wood) opresc razele inutile şi le selectează pe cele optime pentru substanţa fluorescentă utilizată la colorarea preparatului. Deoarece sticla Wood nu opreşte razele roşii şi infraroşii, înainte de a trece prin filtru, lumina străbate o cuvă plină cu o soluţie de $CuSO_4$ 4% care reţine aceste raze.

Întrucât sticla obişnuită opreşte o mare parte din razele UV (mai ales pe cele cu λ mică), lentilele condensator ale lămpii ca şi condensatorul microscopului sunt confecţionate din cuarţ, iar lama de microscop dintr-o sticlă specială care nu reţine razele UV. În felul acesta în preparat ajung numai raze cu lungimea de undă de 3000-4000 Å (cele mai multe de 3600 Å - raze Wood).

Ocularul microscopului este prevăzut cu un filtru special, pentru a preveni orice efect dăunător pentru ochi al razelor UV şi mai ales, pentru a elimina excesul de lumină de excitare care nu ar permite observarea prin contrast a luminii fluorescente.

Pentru obiectivele cu imersie se va folosi în locul uleiului de cedru obişnuit (care prezintă fluorescenţă naturală), un ulei de imersie de tip special lipsit de această proprietate.

În acest dispozitiv, dacă nu se interpune un obiect fluorescent pe traseul razelor ca şi în cazul în care în preparat se găsesc obiecte care nu au proprietatea de fluorescenţă, câmpul apare integral negru.

În cazul în care razele UV cad concentric asupra unor

preparate sau structuri capabile de fluorescenţă, acestea apar luminate şi mai mult sau mai puţin intens colorate.

Avantajele microscopiei cu fluorescenţă:

* permite cercetarea microorganismelor în stare vie şi detectarea lor în celule şi ţesuturi;

* prezintă risc mic de apariţie a unor artefacte deoarece nu necesită fixarea preparatelor, iar fluorocromii sunt folosiţi în diluţii foarte mari.

Dezavantaje:

* necesită instalaţii speciale (sursă specială de lumină) şi optică specială;

* aspectul structurilor evidenţiate prin fluorescenţă poate fi uneori foarte diferit de acela care apare consecutiv utilizării altor tehnici fapt care complică interpretarea observaţiilor.

Precauţii:

* se va evita utilizarea unui microscop fără filtru, deoarece razele UV au o acţiune nocivă asupra ochiului uman, putând produce oftalmii inflamatorii şi leziuni ale corneei;

* intensitatea luminii fluorescente fiind slabă, se recomandă ca examinarea să se facă în cameră întunecată şi după ce ochiul s-a adaptat bine la întuneric.

Aplicaţii practice: Microscopia cu fluorescenţă are aplicaţii în numeroase domenii ale biologiei. În microbiologie este folosită pentru evidenţierea rapidă şi sigură a microorganismelor pe frotiuri

sau secţiuni histologice, chiar când sunt prezente în număr foarte mic. Aplicaţia cea mai frecventă şi mai importantă este legată de testele de imunofluorescenţă imaginate de Coons în care substanţele fluorescente servesc ca "trasor" pentru moleculele de imunoglobulină-anticorp, permiţând evidenţierea şi localizarea "in vivo" a unor proteine străine, virusuri sau microorganisme, iar în imunobiologie permiţând evidenţierea celulelor în care are loc procesul de anticorpogeneză.

Principiul reacţiilor de imunofluorescenţă: Fluorocromii (ex. izotiocianatul de fluoresceină) adăugaţi la o soluţie alcalină de anticorpi au proprietatea de a se "conjuga" chimic cu aceştia. După îndepărtarea excesului de colorant prin dializă, anticorpii astfel marcaţi fluorescent îşi păstrează capacitatea de a se combina cu antigenele respective, ca un colorant imunochimic specific.

Se produce astfel echivalentul unei reacţii serologice tipice, în care antigenul (proteină străină, virus sau bacterie) este "colorat" specific de anticorpul corespunzător fluorescent iar prezenţa şi localizarea sa este evidenţiată cu foarte mare precizie.

Metoda directă (Fig. 23 A) se practică în două etape succesive

a) Substanţa fluorescentă - izotiocianat de fluoresceină este adăugat la un antiser şi se obţine marcarea anticorpilor respectivi;

b) Anticorpii marcaţi sunt adăugaţi antigenului corespunzător şi se obţine o reacţie specifică antigen-anticorp, însoţită de colorarea şi evidenţierea complexului.

Metoda indirectă (Fig. 23 B) nu foloseşte anticorpi marcaţi, ci recurge la un ser anti-anticorpi. Reacţia se efectuează în trei etape succesive:

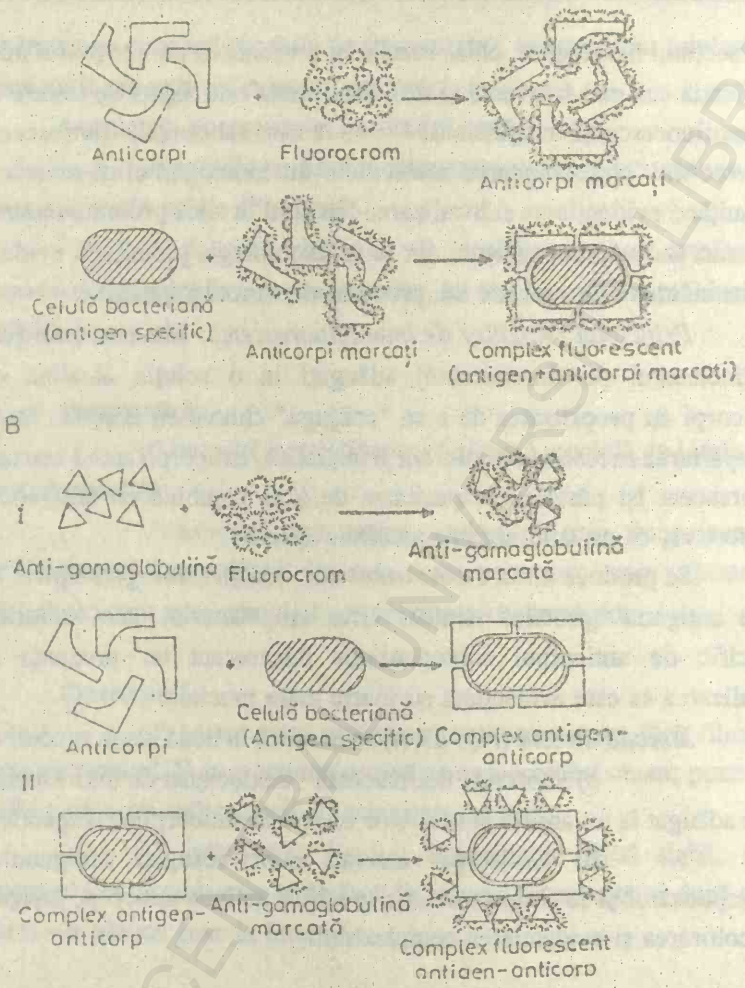


Fig. 23. Reacţiile de imunofluorescenţă: A. metoda directă; B. metoda indirectă.

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

a) Marcarea antiserului antiglobulinic (a anti-anticorpilor) cu izotiocianat de fluoresceină, care devine astfel o suspensie fluorescentă utilizabilă pentru evidenţierea oricărui sistem antigen-anticorp;

b) Punerea în contact a anticorpilor cu antigenul omolog şi obţinerea unui complex antigen-anticorp;

c) Adăugarea serului antiglobulinic marcat (a anti-anticorpilor) la complexul antigen-anticorp, urmată de colorarea specifică şi evidenţierea acestuia.

Metoda indirectă are marele avantaj că permite evidenţierea şi identificarea serologică a virusurilor şi microorganismelor în diferite medii naturale ca şi în ţesuturi, într-un timp scurt deoarece nu necesită prepararea de antiseruri specifice marcate: un singur tip sau cel mult două tipuri de seruri antiglobulinice marcate sunt suficiente pentru a studia numeroase sisteme antigen-anticorp diferite.

6.4. MICROSCOPUL CU CONTRAST DE FAZĂ

Cu unele excepţii (sporii fungilor care conţin pigmenţi cu rol de absorbţie a luminii sau cloroplastele care conţin pigmenţi fotosintetici), preparatele biologice studiate la microscopul fotonic cu câmp clar, în stare vie, apar ca lipsite de structură, datorită lipsei de contrast propriu. Aceasta face ca detaliile interne să fie greu de evidenţiat, exceptând cazul în care diferenţele de culoare sau de "intensitate" ale diferiţilor constituienţi sunt mărite artificial cu ajutorul unor tehnici speciale.

În cazul microorganismelor, una din dificultăţile examinării în

stare vie o constituie, pe lângă dimensiunile lor mici, faptul că au un indice de refracţie foarte apropiat de acela al lichidului în care sunt suspendate.

Se ştie că un obiect incolor aflat într-un mediu incolor, sau un obiect colorat aflat într-un mediu cu aceeaşi culoare, pot fi percepute vizual numai dacă diferă de mediul lor, printr-o capacitate diferită de absorbţie a luminii datorită unei grosimi sau unui indice de refracţie deosebit. Când această diferenţă este suficient de mare, obiectul poate fi văzut uşor la microscopul cu câmp clar.

În cazul celulelor bacteriene vii, diferenţele naturale dintre obiect şi mediul său, în ce priveşte refringenţa şi capacitatea de transmitere a luminii (determinată de grosime) sunt foarte mici. Ca urmare, razele de lumină care le traversează nu îşi modifică amplitudinea, dar suferă o întârziere (o rămânere în urmă a unora, în raport cu altele), care dă naştere la diferenţe de fază între undele care formează imaginea. Datorită faptului că ochiul uman nu sesizează aceste diferenţe de fază, detaliile de structură nu pot fi evidenţiate, decât dacă contrastul lor (respectiv capacitatea de a absorbi razele de lumină) este amplificat în mod artificial prin fixare şi colorare. Acest procedeu are însă dezavantajul că implică omorârea bacteriilor şi fixarea lor într-un anumit stadiu metabolic, la care se adaugă riscul apariţiei unor modificări structurale sau a unor structuri false, datorate precipitării proteinelor celulare.

BCU IASI

Modul de formare a imaginii în microscopul cu contrast de fază

În microscopul cu câmp clar, imaginea unui obiect necolorat este formată prin recombinarea razelor de lumină centrale, transmise de obiect, cu cele difractate de suprafaţa lui şi apare înconjurată de imaginea mediului. Dacă indicele de refracţie al obiectului este egal cu al mediului, cele două fascicule de raze (centrale şi difractate) ajung în planul imaginii la o fază foarte puţin diferită şi, ca urmare, obiectul nu va contrasta faţă de mediu. Dacă însă diferenţa de refringenţă este mare, contrastul va fi evident.

Microscopul cu contrast de fază este astfel construit încât pune în evidenţă în mod deliberat diferenţele de fază, şi ulterior le transformă prin fenomenul de interferenţă, în diferenţe de amplitudine (de intensitate) a luminii perceptibile de către ochiul omenesc.

Datorită acestui fapt, înţelegerea modului de formare a imaginii în microscopul cu contrast de fază este condiţionată de înţelegerea fenomenului de interferenţă.

Interferenţa

Fenomenul de interferenţă acţionează şi în cazul undelor de lumină, la care după cum a demonstrat *Young*, lumina adăugată la lumină nu produce totdeauna mai multă lumină, ci în mod paradoxal în anumite condiţii poate produce întuneric.

În experienţa sa, un fascicul de radiaţii luminoase monocromatice (având aceiaşi lungime de undă şi deci aceeaşi culoare) au fost proiectate paralel pe un ecran având două fante (deschideri) apropiate.

Cele două raze emergente care străbat fantele sunt apoi proiectate pe un al doilea ecran situat la oarecare distanţă.

Contrar aşteptărilor razele emergente nu luminează omogen ecranul în zonele opuse fantelor, ci determină apariţia unor benzi luminoase care alternează cu benzi întunecate, după o anumită simetrie.

Acest fenomen este datorat fenomenului de interferenţă între cele două unde luminoase în sensul că ori de câte ori cele două fascicule de raze se întâlnesc "în fază" se produce însumarea lor prin procesul de *"interferenţă constructivă"*; intensitatea luminii este maximă şi pe ecran vor apărea zone intens luminate.

Ori de câte ori undele ajung "defazate" (în decalaj de fază, respectiv una întârziată faţă de alta cu 1/2 λ) se produce anularea lor prin fenomenul de "interferenţă destructivă". Ca urmare zonele corespunzătoare vor apărea negre pe ecranul pe care s-a făcut proiecţia.

Zonele intermediare între aceste două extreme corespunzând unor diferenţe de fază mai mici, vor prezenta o luminozitate corespunzătoare treptelor intermediare respective.

În microscopia cu contrast de fază cele două fascicule de lumină care străbat crăpăturile ecranului pentru a forma imagini de interferenţă (experienţa lui *Young*) sunt înlocuite cu două categorii de unde luminoase şi anume corespunzând *luminii transmise sau de fond* şi *luminii difractate* de obiectul examinat. Rezultatul interferenţei lor este evident în imaginea "primară" mărită în funcţie de puterea obiectivului şi localizată puţin sub extremitatea superioară a tubului ocular, în aşa zisul "plan al imaginii", care corespunde ecranului de

proiecţie din experienţa lui *Young*.

În consecinţă, formarea imaginii în microscopul cu contrast de fază poate fi considerată ca rezultantă a unui fenomen de interferenţă, aşa cum se produce în forma cea mai simplă în experienţa citată.

Microscopul cu contrast de fază este în practică un microscop fotonic obişnuit, pentru câmp clar, la care se adaugă două dispozitive speciale, având rolul de a mări diferenţele de fază dintre razele care formează imaginea şi anume *"inelul de fază"* (fixat în cel mai coborât plan focal al condensatorului) şi *placa de fază* fixată înapoia planului focal al obiectivului.

După cum am arătat imaginea la acest tip de microscop se realizează prin interferenţa a două "seturi" de raze: *razele transmise* (sau de fond) şi *razele de difracţie* aflate unele faţă de altele în decalaj de fază (Fig. 24).

Inelul de fază - care este o placă de sticlă sau de metal - opreşte trecerea luminii în condensator, cu excepţia unei zone inelare, concentrică cu axul sistemului de lentile. Ca urmare, iluminarea condensatorului este inelară - ca un cilindru gol - care este focalizat apoi, pentru a da un con "gol" sub şi deasupra preparatului.

Placa de fază - montată în obiectiv este gravată cu un şanţ circular. Întregul fascicul inelar trece prin zona gravată. Dacă pe platina microscopului este pus un obiect de examinat, toate radiaţiile care îl străbat fără a fi deviate din traseul lor, vor trece prin "inelul" gravat al plăcii de fază şi vor reprezenta lumina transmisă sau lumina de fond.

BCU IAŞI - BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

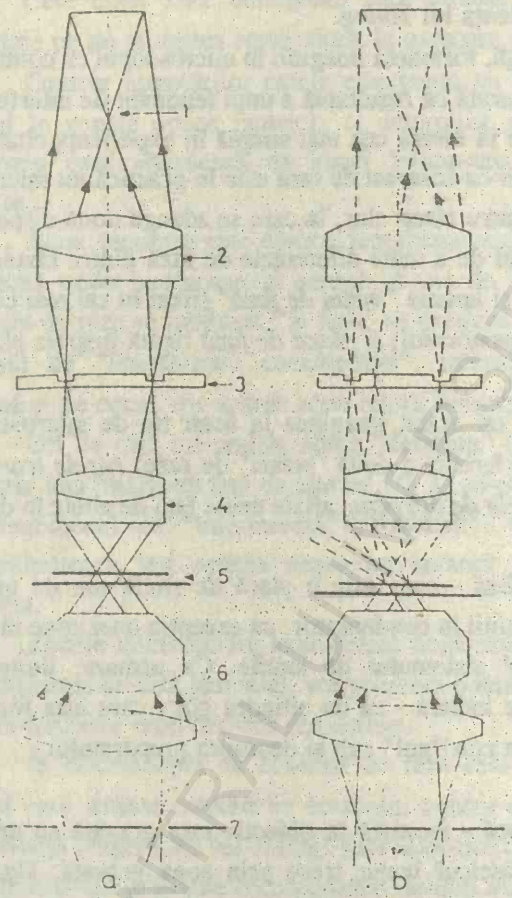


Fig. 24. Ilustrarea diagramatică a traseului razelor de lumină în microscopul cu contrast de fază: a) Traseul razelor transmise; b) Traseul razelor difractate: 1 = ochi; 2 = ocular; 3 = placa de fază în planul focal posterior al obiectivului; 4 = obiectivul; 5 = preparatul; 6 = condensatorul; 7 = diafragma inelar.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celelalte raze incidente care sunt deviate în diferite zone ale preparatului, vor fi dispersate pe faţa obiectivului şi chiar în afara lui.

Cele care pătrund în obiectiv se propagă în interiorul microscopului cu contrast de fază, dar întrucât datorită dispersiei ele sunt incidente pe lentila frontală sub toate unghiurile, vor străbate placa de fază practic prin toate părţile sale, inclusiv "inelul" gravat. Întrucât acest "inel" gravat reprezintă numai o mică parte raportat la suprafaţa plăcii, cele mai multe raze vor străbate zonele negative, mai groase ale plăcii de fază situate în interiorul şi în afara inelului. La ieşirea din placa de fază există astfel o separare aproape perfectă între două categorii de raze: *razele transmise*, de fond, nedeviate (care au trecut toate prin "inelul" gravat al plăcii), şi *"razele difractate"* care au trecut prin întreaga placă de fază.

În planul imaginii intermediare aceste raze "se recombină" pentru a forma o imagine de interferenţă. Razele care pornesc practic din acelaşi punct al preparatului se vor reîntâlni în acelaşi punct al imaginii.

Gradul de iluminare ale unui punct dat este dependent de "faza" în care se găsesc razele care cad în acel punct.

Ca regulă generală, după cum am arătat, razele de lumină care se întâlnesc *"în fază"* produc maximum de lumină, deoarece *"se întăresc"* unele pe altele. Razele care cad cu un unghi de fază de 180° (respectiv cu o diferenţă de 1/2 λ) produc maximum de interferenţă *"destructivă"* (anulare) şi ca urmare minimum de lumină.

Diferenţele de fază cuprinse între 0° - 180° (0-1/2 λ) au drept urmare grade diferite de interferenţă, gradul de strălucire (de luminozitate) netă descrescând de la 0° spre 180°.

În acest mod, fenomenul de interferenţă, care joacă un rol esenţial în producerea imaginii prin contrast de fază ne dă posibilitatea de a folosi razele difractate (deviate de preparat) pentru a obţine o gamă completă de intensităţi de la maximum (alb) până la minimum (negru), trecând printr-un spectru continuu de nuanţe de cenuşiu între ele.

În felul acesta apare o imagine cu contraste, derivată de la un obiect, care nu determină prin natura sa diferenţe în intensitatea radiaţiilor care-l străbat. Evident însă că după interferenţa celor două tipuri de raze (transmise şi difractate într-un anumit punct) fluxul energetic rezultat, poate fi reprezentat de o singură rază cu amplitudine modificată, mărită, diminuată, sau nulă.

Contrastul de fază obţinut este de două tipuri:

1) ***Contrast întunecat*** corespunzând situaţiei în care imaginea detaliilor de structură ale obiectului apare mai întunecată (neagră) decât fondul preparatului. Se produce când cele două fascicule de raze (transmise şi difractate) ating planul imaginii cu o diferenţă de fază de $\lambda/2$.

2) ***Contrast luminos*** corespunzând situaţiei în care se produce o imagine luminoasă a obiectului pe un fond întunecat. Se produce când razele de lumină transmise (de la sursă) sunt întârziate în aşa fel încât ajung la planul imaginii în aceeaşi fază cu razele difractate.

În felul acesta, în cazul contrastului de fază întunecat (sau pozitiv), imaginea structurilor cu indice de refracţie mai mare decât mediul, apare mai întunecată, în timp ce aceea a structurilor mai puţin refringente apare mai luminoasă decât imaginea fondului. Aspectul

este invers în contrastul de fază negativ.

Prin comparaţie, putem spune că, contrastul de fază luminos poate poate fi considerat ca similar microscopului cu câmp întunecat (câmp negru), iar contrastul de fază întunecat ca similar, microscopul fotonic cu câmp clar.

Microscopia cu contrast de fază reprezintă o metodă extrem de utilă în biologie în general şi în microbiologie în special. Ea este utilizată în practică pentru decelarea şi localizarea bacteriilor vii în ţesuturi, pentru studiul creşterii şi multiplicării, al sporulării, al mişcării flagelilor etc. ca şi pentru observarea dinamică a diferitelor structuri celulare fine, având avantajul de a permite studiul micro-organsimelor vii, fără nici o intervenţie care le-ar putea modifica sau altera aspectul natural al structurii lor.

6.5. MICROSCOPUL ELECTRONIC

Partea optică a microscopului care include sursa de electroni "lentilele" condensator, obiectiv şi ocular, camera port-obiect şi ecranul fluorescent sunt asamblate într-o coloană verticală prin suprapunere (Fig. 25). În partea inferioară se găsesc pompa de vid, circuitele electrice care furnizează potenţialul ridicat din "tunul" microscopului şi curenţii pentru lentile. Aparatul este blindat special pentru a evita acţiunea câmpului magnetic terestru, care ar devia electronii. Sursa de electroni este reprezentată de un catod generator de electroni prin termoemisie (un filament de tungsten, încălzit la incandescenţă, prin trecerea unui curent electric de înaltă frecvenţă).

BCU IAŞI

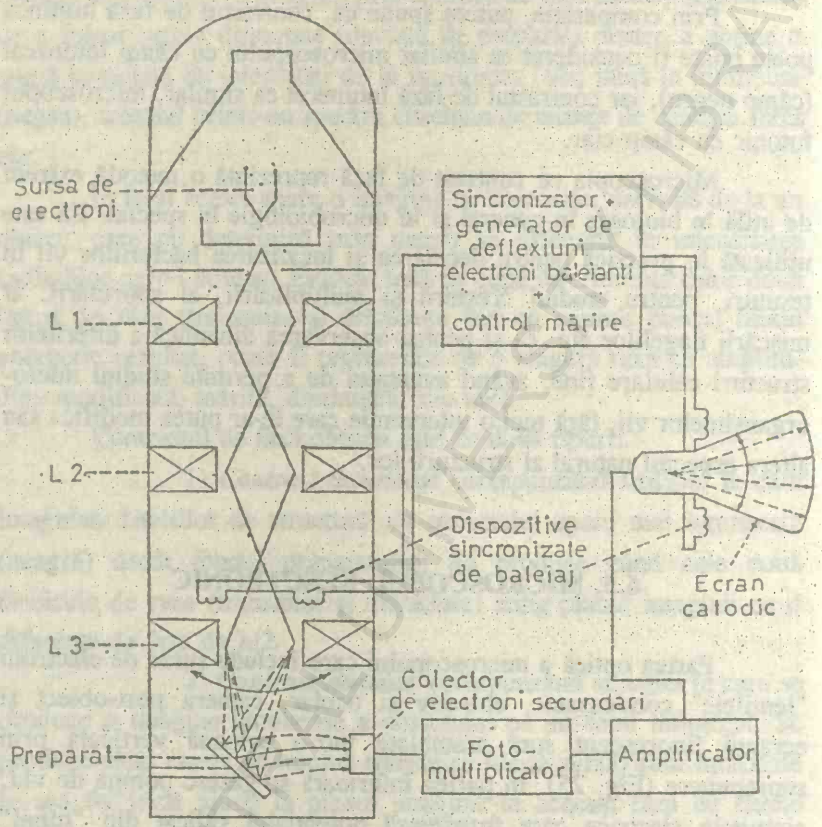


Fig. 25. Ilustrarea schematică a funcţionalităţii principalelor componente ale microscopului electronic.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Undele electronice eliberate iniţial cu viteză mică sub influenţa căldurii sunt transmise prin vid înalt (10^{-5} mm Hg) pentru a evita dispersia lor şi o viteză accelerată considerabil, datorită unei diferenţe de potenţial de 50.000-100.000 volţi (prezenţa aerului ar modifica traiectoria electronilor, în urma ciocnirii lor cu moleculele de aer, fapt care ar duce la slăbirea calităţii imaginilor).

Utilizarea unei tensiuni mari este neapărat necesară, deoarece pentru a creşte puterea de rezoluţie a microscopului este nevoie de unde cu lungimi cât mai scurte, iar lungimea de undă (λ) a fasciculului de elecroni este în funcţie de voltaj.

În continuare fasciculul de electroni traversează lentila condensator, care îl grupează în fascicule foarte înguste şi paralele, concentrându-l pe o mică suprafaţă a preparatului, după care pătrunde în camera acestuia, unde întâlneşte obiectul de studiat.

Fasciculul de electroni care a traversat preparatul suferă, în funcţie de natura şi grosimea acestuia, devieri de la traseul său normal (devenind mai divergent), trece apoi prin cea de a doua "lentilă" obiectiv, component esenţial de care depinde calitatea aparatului. "Obiectivul" adună fasciculele de electroni pentru a forma o imagine intermediară a preparatului după care ele traversează a treia "lentilă" - *sistemul proiector* sau *ocularul* - (echivalent lentilei de proiecţie a unui microscop fotonic pregătit pentru microfotografie), care dă imaginea finală vizibilă, pe un ecran luminiscent, sau care poate fi înregistrată pe o placă fotografică.

Imaginile electronice iau naştere în condiţii puţin diferite de imaginile luminoase şi anume:

- dacă obiectul studiat este opac la electroni,

imaginea va corespunde conturului său;

♦ dacă grosimea lui este suficient de mică, pentru a putea fi străbătut de fasciculul electronic, obiectivul va deveni "transparent" pentru electroni, cu menţiunea că fiecare electron este mai mult sau mai puţin deviat în drumul său în funcţie de particularităţile fizico-chimice ale zonei prin care traversează preparatul (unghiul de deviaţie este proporţional cu grosimea şi masa substanţei din zona traversată). Această variaţie se traduce pe imaginea finală printr-o diferenţă de opacitate.

Acest mod de formare a imaginii justifică denumirea de *microscop electronic prin transmisie* dată microscopului electronic uzual numit şi *convenţional*.

Preparatele biologice ce urmează a fi examinate la microscopul electronic trebuie să îndeplinească următoarele condiţii menite să asigure obţinerea unor imagini de calitate, în condiţiile particulare ale examinării lor:

1) Să fie astfel pregătite încât să-şi păstreze toate caracteristicile structurale, în condiţiile de examinare în vid şi sub bombardamentul de electroni. Acest lucru se realizează printr-o serie de operaţiuni preliminare care includ recoltarea în condiţii speciale, fixarea, deshidratarea, incluzionarea, secţionarea etc.

2) Să nu fie prea groase - respectiv să nu depăşească grosimea de 30-40 nm în cazul secţiunilor ultrafine *incluzionate*.

3) Să nu fie nici prea subţiri, deoarece în aceste condiţii s-ar obţine o imagine insuficient contrastantă.

4) Să fie neutre faţă de electroni, adică să nu se încarce cu electricitate şi să nu se ionizeze.

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

În mod curent, într-o primă etapă după recoltare, cu precauţiuni speciale, preparatele biologice (celule, fragmente de ţesuturi sau organe) sunt fixate cu tetraoxid de osmiu (OsO_4) soluţie 2% în tampon acetat veronal 2% la pH = 7,2-7,4 (fixator Palade) sau cu glutaraldehidă bicromat de K, permanganat de potasiu. Fixarea este una dintre cel mai importante etape ale pregătirii preparatului, deoarece poate determina apariţia unor artefacte care duc la apariţia unor imagini neconforme cu realitatea.

Se recomandă ca să se facă în paralel mai multe tipuri de fixări, care să permită un studiu comparativ.

Preparatele fixate sunt deshidratate în băi succesive de alcool, cu concentraţii progresiv crescânde (70°, 90°, alcool absolut) după care sunt incluzionate în răşini sintetice, care în anumite condiţii au proprietatea de a se polimeriza.

Se folosesc obişnuit metacrilaţii, araldita, vestopalul etc. Polimerizarea se face în capsule speciale de gelatină, în care preparatele sunt suficient de dure pentru a fi secţionate după păstrare timp de 48 ore la 45°C.

Secţionarea se face la ultramicrotom cu ajutorul unor "cuţite" speciale de sticlă dură.

Preparatul de cercetat este montat pe un suport, care nu este o lamă de sticlă, ci o peliculă foarte fină (grosime de 10 nm) lipsită de structură la microscopul electronic şi reprezentată de un film de *formvar* (polivinil-formol diluat în diclorură de etilen) sau de *parlodion*. Membranele se obţin prin evaporarea solventului dintr-un strat subţire al unei soluţii diluate a materialului plastic, respectiv, depus pe suprafaţa unui lichid (apă distilată). Este necesar ca solventul să fie

nemiscibil cu apa. În aceste condiţii, dacă o picătură din soluţia de formvar este depusă pe suprafaţa apei, într-un recipient, ea se etalează spontan într-un strat monomolecular, din care solventul se evaporă foarte repede. Membrana este apoi depusă pe o grilă de oţel inoxidabil, de aluminiu sau aur platinat cu găuri de 0,2 mm. Grila, pe lângă rolul de susţinere a membranei are şi pe acela de absorbţie şi dispersie a căldurii degajate în timpul examinării, datorită bombardamentului electronic la care este supus preparatul.

Preparatul este examinat prin orificiile grilei, după ce a fost introdus în camera portobiect printr-un sistem de ecluză (sas), pentru a evita pătrunderea aerului, ceea ce ar necesita refacerea vidului.

Ecranul fluorescent transformă imaginea dată de "lentila" proiectoare în imagine luminoasă, datorită faptului că sulfura de zinc sau de cadmiu cu care este acoperit devin fluorescente în momentul bombardării cu electroni.

Preparatul de studiat. În ciuda vitezei lor extrem de mari, electronii sunt foarte reppedeopriţi sau dispersaţi dacă întâlnesc un preparat biologic a cărui grosime depăşeşte 0,2 μm. De aceea, obiectele mai groase sunt secţionate cu ajutorul unui microtom special, pentru a avea o grosime inferioară acestei limite şi supuse unor prelucrări prealabile, menite să asigure mărirea contrastului între diferitele părţi ale preparatului. Preparatele biologice neprelucrate au în general un contrast slab, datorită densităţii foarte apropiate a diferiţilor constituienţi celulari.

Mărimea contrastului imaginii se poate realiza prin mai multe artificii de tehnică şi anume:

- variind tensiunea de accelerare a electronilor

(contrastul este mai mare când electronii au viteză mai mică);

♦ impregnând preparatul cu unele metale grele sau cu sărurile lor, care uneori realizează *"colorări"* suficient de selective, pentru a juca un rol echivalent coloranţilor uzuali folosiţi în microscopia fotonică;

♦ depunând un strat subţire de metal prin pulverizare sub o anumită incidenţă pe suprafaţa preparatului (umbrire prin metalizare).

Acest ultim procedeu dă informaţii suplimentare numai asupra reliefului preparatului nu şi asupra structurii sale interne.

În mod obişnuit secţiunile ultrafine sunt "colorate" în vederea măririi contrastului imaginii electronice, folosind drept "coloranţi" uzuali acetatul de uraniu sau citratul de plumb.

Tehnica colorării negative folosită curent pentru studiul virusurilor, bacteriilor şi al secţiunilor ultrafine are la bază posibilitatea de a înconjura preparatele biologice, cu o substanţă cu greutate atomică mare, în aşa fel încât electronii sunt mai puternic dispersaţi în vecinătatea acestora. În consecinţă particulele examinate apar în imagine (pe ecranul fluorescent) luminoase pe un fond negru.

Se foloseşte în mod curent fosfotungstatul de potasiu.

Tehnica are numeroase avantaje, fiind simplă, rapid de executat, necesitând substanţe puţine şi uşor accesibile.

Preparatele biologice apar în general bine conservate, iar contrastul obţinut este foarte bun. Rezoluţia obţinută prin această tehnică este înaltă permiţând evidenţierea chiar a unor structuri de 1 nm. Tehnica are dezavantajul că nu poate fi aplicată decât pentru studiul particulelor izolate.

Descoperirea microscopului electronic şi punerea la punct a diferitelor tehnici de îmbunătăţire a imaginilor date de el, a avut un rol deosebit de important în descifrarea organizării moleculare a virusurilor şi stabilirea structurilor fine ale celulelor.

Microscopia electronică are însă o serie de dezavantaje, de care trebuie ţinută seama în interpretarea rezultatelor şi anume:

1) Nu permite examinarea celulelor vii, în activitate, ci numai după uscare şi fixare, şi în condiţii de vid înalt, care cel puţin în unele cazuri pot determina alterări morfologice;

2) Puterea de pătrundere a fasciculului de electroni este foarte mică;

3) Nu dă indicaţii privind natura chimică a constituienţilor şi structurilor evidenţiate.

De aceea, este necesar ca rezultatele microscopiei electronice să fie corelate cu cele obţinute cu ajutorul altor metode (coloraţii selective, microscopie în contrast de fază etc.).

6.6. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ CU BALEIAJ (SCANNING)

După cum am arătat, atât microscopul fotonic cât şi cel electronic convenţional ("cu transmisie") dau imagini bidimensionale reprezentate de zone de întuneric şi lumină produse de trecerea luminii sau a electronilor printr-o secţiune fină a preparatului.

Microscopul fotonic prezintă o imagine bidimensională deoarece are o foarte limitată profunzime de câmp, determinată de faptul că radiaţiile pot fi focalizate net numai într-un singur plan. Dacă

preparatul este foarte transparent, focarul se poate ajusta la diferitele profunzimi, dar imaginea este neclară datorită interacţiunii luminii cu materialul existent în preparat, deasupra şi dedesubtul planului focarului.

De aceea microscopul fotonic permite cel mai bine examinarea unor probe subţiri vizibile cu ajutorul luminii transmise, sau a unor preparate plate, vizibile cu lumina reflectată.

El permite evidenţierea formei preparatului în profunzime numai cu măriri slabe (sub 200 x).

Microscopul electronic cu transmisie necesită chiar preparate mai subţiri, deoarece câmpul magnetic al lentilelor obiectiv poate focaliza într-o singură imagine plană numai acei electroni care ies din preparat cu aceiaşi energie. De aceea în cele mai multe cazuri sunt folosiţi în formarea imaginii electroni care au fost deviaţi dar a căror energie nu a fost modificată. În schimb electronii care ies din preparat cu un spectru larg de energie, vor fi reflectaţi (deviaţi) în cursul trecerii lor prin lentilele magnetice şi imaginea va fi lipsită de claritate. Pentru ca o mare parte din electroni să-şi păstreze energia nealterată, proba de examinat trebuie să fie foarte subţire (nu mai groasă de 50 nm respectiv 1/1000 din diametrul unei celule vii tipice), chiar pentru un fascicul de electroni cu o energie de 50.000-100.000 volţi.

Trăsătura cea mai importantă a imaginilor oferite de microscopul electronic cu baleiaj este calitatea lor tridimensională cu totul remarcabilă datorită căreia imaginea ochiului unei insecte, a unei hematii, a unui fir de păr sau a unor fotoreceptori prezintă un aspect apropiat de realitate, care lipseşte tuturor tipurilor de imagini obţinute

cu alte microscoape.

Sub denumirea de baleiaj (fr. *ballayage* - derivat din cuvântul francez *balayer* - a curăţa cu mătura) s-a încetăţenit în electronică acţiunea de parcurgere a suprafeţei ecranului luminiscent al unui tub catodic, de către un fascicul electronic.

Termenul englezesc *"scanning"* derivat de la verbul *to scan* - a explora, a examina atent, cu grijă, a analiza atent succesiv toate părţile unui obiect, are în tehnică un sens similar şi anume acela de a determina parcurgerea unei regiuni anumite în toate părţile sale componente, cu ajutorul unui fascicul controlat.

Microscopul electronic cu baleiaj (MEB) este în esenţă, un sistem de televiziune în circuit închis, cu oarecare complexitate de construcţie în care preparatul este iluminat de un fascicul punctiform, foarte fin şi mobil de electroni.

Este demonstrat că atunci când suprafaţa unui obiect este "măturată" de un fascicul fin de electroni pot fi puse în evidenţă cu ajutorul electronilor reflectaţi sau cu ajutorul electronilor secundari emişi de obiect, detaliile de structură ale acestei suprafeţe sub forma unei imagini tridimensionale. În felul acesta, microscopul cu baleiaj nu înregistrează electronii care trec prin preparat, ci colectează electronii secundari care sunt eliberaţi de la suprafaţa obiectului de fasciculul de electroni incident.

Microscopul cu baleiaj adaptat în special pentru examinarea suprafeţei obiectelor solide, poate fi folosit şi în biologie, deoarece iradierea cu ajutorul fasciculului de electroni folosit de el, nu este atât de puternică încât să distrugă preparatele biologice.

Modul de funcţionare

Fasciculul de electroni emis de un catod de tungsten este trecut sub vid înalt printr-o serie de lentile magnetice, care îl micşorează de la mărimea sa iniţială (25.000-50.000 nm) la un fascicul subţire de maximum 10 nm. Acest fascicul luminează preparatul producând emisia de electroni secundari care sunt colectaţi de un colector de electroni secundari. Semnalul astfel obţinut este amplificat şi permite regularizarea intensităţii luminoase a fasciculului transformat şi proiectat pe suprafaţa unui ecran catodic similar tubului principal al unui aparat de televiziune. Pe de altă parte, fasciculul punctiform care a luminat preparatul este deviat şi deplasat de-a lungul acestuia graţie unui dispozitiv similar, ce deplasează punctul care luminează ecranul catodic. În felul acesta suprafaţa preparatului poate fi "măturată" în mod continuu de un punct care se deplasează de la stânga la dreapta într-o serie de linii succesive de jos în sus, fiecare corespunzând unei mici porţiuni de preparat. În acest mod, pe ecranul catodic se formează imaginea vizibilă a suprafeţei preparatului. În timp ce pentru observarea vizuală a imaginii televizate se lucrează cu un fascicul de electroni care se deplasează rapid, pentru a obţine microfotografii de cea mai bună calitate şi de înaltă rezoluţie, se foloseşte un fascicul de electroni care se deplasează lent şi o expunere care poate să atingă câteva minute.

La microscopul electronic cu baleiaj pot fi examinate diferite preparate biologice: organisme întregi şi nesecţionate, celule întregi sau celule secţionate. Unele insecte (***Drosophila melanogaster***, ***Tribolium compusum*** etc.) supravieţuiesc în camera de vid a microsocpului şi pot fi examinate fără nici un tratament prealabil.

Unele preparate cu suprafeţe tari (fire de păr, smalţ dentar) se pot examina direct, fără nici o tratare prealabilă. Celulele şi ţesuturile sunt supuse unei pregătiri prealabile, mult mai simplă şi mai rapid de executat decât pentru microscopia electronică convenţională: deshidratare prin criodesicare, dublă fixare cu glutaraldehidă şi tetraoxid de osmiu, deshidratare cu alcool sau acetonă şi uscare la cald, sau mai recent, deshidratare în freon încălzit deasupra punctului critic. Preparatele uscate, montate pe un portobiect sunt acoperite în vid cu un strat subţire de metal (aur, paladiu etc.) care are rolul de a mări producerea de electroni secundari şi de a asigura difuziunea energiei termice şi electrice, care au tendinţa de a se acumula la suprafaţa preparatului, putând deforma imaginea finală obişnuită.

Avantajele microscopului cu baleiaj decurg din:

- posibilitatea de a studia obiecte cu grosime şi dimensiuni relativ mari (până la câţiva cm);
- uşurinta şi marea rapiditate cu care se pot pregăti probele de examinat;
- posibilitatea de a observa topografia suprafeţei diferitelor obiecte (celule, insecte etc.) fără a mai face "copii" ale lor, cu o claritate şi profunzime de fond imposibil de obţinut cu oricare altă metodă;
- posibilitatea de a trece foarte uşor de la o imagine în mare a preparatului la o examinare în detaliu printr-un sistem de transfocator, care permite trecerea rapidă, succesiv, spre exemplu, de la o mărire de 200 x la 500 x, 5000 x ş.a.m.d.

Dezavantaje. În afară de preţul de cost ridicat, microscopia cu baleiaj are dezavantajul unei puteri relativ mici de mărire finală (x 15,

100.000) cu menţiunea că dincolo de 20.000 x imaginea devine neclară; are o putere mică de rezoluţie (teoretic 10-20 nm, practic chiar mai mică) în comparaţie cu microscopia electronică convenţională (0,2 - 0,5 nm) ceea ce corespunde unei măriri efective de 1.000.000 x.

Microscopia cu baleiaj nu oferă posibilitatea de studiere a detaliilor celulare.

Utilizată curent în diferite ramuri ale biologiei şi patologiei, microscopia electronică cu baleiaj permite o evidenţiere directă a unor structuri complexe, completând rezultatele obţinute cu celelalte tipuri de microscoape, reprezentând în acelaşi timp un instrument foarte util pentru învăţământ.

7. MORFOLOGIA ŞI DIMENSIUNILE BACTERIILOR

7.1. MORFOLOGIA BACTERIILOR

Forma şi dimensiunile bacteriilor sunt elemente importante pentru diferenţierea şi clasificarea lor. Morfologia tipică a bacteriilor este dată de aspectul pe care-l prezintă celulele tinere, active din punct de vedere fiziologic, în condiţii favorabile de mediu.

În general, la bacterii se disting 5 tipuri morfologice fundamentale (Fig. 26):

- rotund (cocoid);
- alungit - cilindric (bacilar);
- spiralat;

BCU IASI

- filamentos;
- pătrat.

1. TIPUL COCOID - cuprinde bacteriile numite generic coci. Cocii sunt sferici, elipsoidali sau neregulaţi, cu diametrele celulei aproximativ egale.

Celulele sunt sferice la *Staphylococcus aureus* atunci când sunt izolate sau ovale, turtite pe o latură când sunt grupate. Au diametrul cuprins între 0,8-1 μm cu variaţii în cadrul speciei.

Stafilococii prezintă o dispoziţie caracteristică în grămezi neregulate sau ciorchine. Această dispoziţie se observă mai ales în culturile dezvoltate pe mediu solid (geloză). În medii lichide (bulion) se dezvoltă în lanţuri scurte sau grupări în diplo. Sunt bacterii nesporulate, neciliate, deci imobile şi Gram-pozitive.

Staphylococcus aureus este o bacterie saprofită cu o largă răspândire în mediul înconjurător, în aer, praf şi pe obiecte de uz zilnic. Se întâlneşte pe piele, mucoase şi în cavităţile naturale ale omului şi animalelor. Pe lângă formele comensale, stafilococii prezintă şi forme parazite, patogene, capabile să producă variate procese infecţioase dintre care menţionăm: furunculoza, infecţii bronşice şi pulmonare, toxiinfecţii alimentare.

Celulele de formă elipsoidală sunt întâlnite la genul *Streptococcus (Streptococcus pyogenes)*. Celulele au diametrul de 0,8-1 μm şi sunt dispuse în diplo sau în lanţuri de lungimi variabile, funcţie de specie, tulpină şi de condiţiile de cultivare. Streptococii sunt imobili (cu excepţia unor tulpini de enterococi), nesporulaţi, necapsulaţi şi Gram-pozitivi.

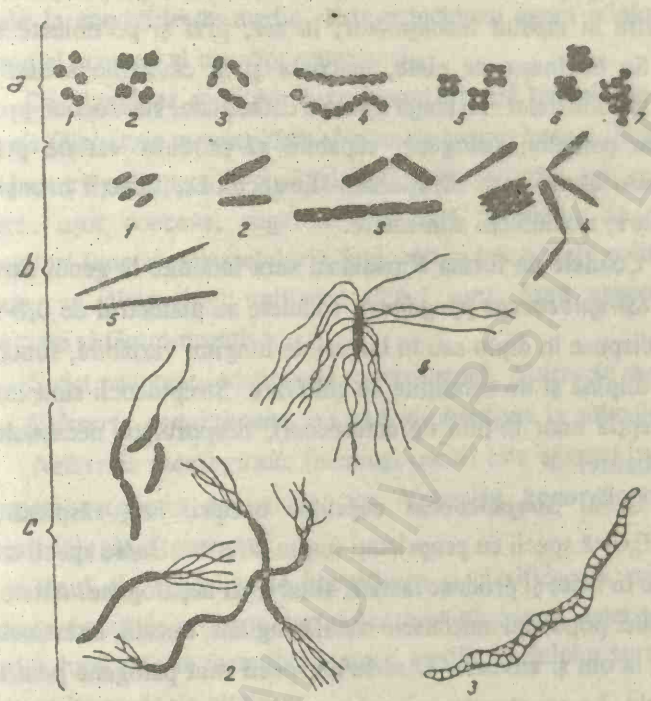


Fig. 26. Morfologia bacteriilor:

a) forma şi aranjarea cocilor: 1 - izolaţi; 2,3 - în diplo; 4 - în lanţ; 5 - în tetrade; 6 - în sarcine; 7 - în ciorchine;

b) forma şi aranjarea bacililor: 1 ,2 - bacili izolaţi cu capetele rotunjite; 3 - bacili în diplo şi în lanţ cu capetele drepte; 4 - bacili izolaţi şi în palisadă cu capetele măciucate; 5 -bacili fusiformi;

c) forme de bacterii spiralate: 1 - vibrioni; 2 - spirili; 3 - spirochete.

BCU IAŞI - CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Staphylococcus aureus este o bacterie saprofită cu o largă răspândire în mediul înconjurător, în aer, praf şi pe obiecte de uz zilnic. Se întâlneşte pe piele, mucoase şi în cavităţile naturale ale omului şi animalelor. Pe lângă formele comensale, stafilococii prezintă şi forme parazite, patogene, capabile să producă variate procese infecţioase dintre care menţionăm: furunculoza, infecţii bronşice şi pulmonare, toxiinfecţii alimentare.

Celulele de formă elipsoidală sunt întâlnite la genul *Streptococcus (Streptococcus pyogenes)*. Celulele au diametrul de 0,8-1 μm şi sunt dispuse în diplo sau în lanţuri de lungimi variabile, funcţie de specie, tulpină şi de condiţiile de cultivare. Streptococii sunt imobili (cu excepţia unor tulpini de enterococi), nesporulaţi, necapsulaţi şi Gram-pozitivi.

Genul *Streptococcus* cuprinde bacterii larg răspândite în natură. Există specii cu proprietăţi foarte diferite. Unele specii trăiesc saprofite în lapte şi produse lactate, fiind total nepatogene. Altele sunt comensale, populând mucoasele nazofaringiană, bucală, intestinală sau genitală la om şi animale. O serie de specii sunt patogene pentru om şi animale. La om streptococii patogeni provoacă infecţii cu localizări variate: angina, scarlatina, erizipelul, flegmoane etc.

La *Diplococcus (Streptococcus) pneumoniae*, cocii au formă ovalară, lanceolată (flacără de lumânare) cu capetele bombate. Celulele au diametrul de 0,5-1,25 μm cu aşezare tipică în diplo. Pneumococul este o bacterie nesporulată, necapsulată (variantele patogene sunt capsulate), imobilă şi Gram pozitivă.

Diplococcus (Streptococcus pneumoniae) este un comensal obişnuit al căilor respiratorii superioare, fiind prezent la 30-70% din

persoanele sănătoase. Nu se găseşte liber în natură din cauza sensibilităţii sale la condiţiile de mediu. Este principalul agent etiologic al pneumoniei acute şi al bronhopneumoniei.

De asemenea cocii pot fi reniformi, formă întâlnită la genul *Neisseria (Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae)*. În frotiuri aceste bacterii au aspect de coci asimetrici, grupaţi câte doi, cu feţele adiacente uşor concave, sugerând imaginea "boabelor de cafea", intracelulari (uneori extracelulari), înglobaţi în leucocitele polimorfonucleare, cu dimensiuni uniforme (0,6-1 μm). Sunt nesporulate, necapsulate şi Gram-negative.

Strict patogene, adaptate la specia umană, *Neisseria meningitidis* si *Neisseria gonorrhoeae*, nu au fost observate la animale.

Neisseria meningitidis (meningococul) este agentul cauzal al meningitei cerebrale epidemice, iar *Neisseria gonorrhoeae* este agentul etiologic al gonoreei.

Unul din criteriile de identificare şi clasificare a cocilor îl constituie modul de grupare a celulelor după diviziune, determinat de planurile după care se face diviziunea şi tendinţa celulelor surori de a rămâne unite unele de altele.

♦ Când diviziunea se face după un singur plan, iar celulele rămân izolate, acestea poartă numele de micrococi (*Micrococcus ureae*). *Micrococcus ureae* este o bacterie care prezintă celule sferice, cu diametrul de 0,8-1 μm, dispuse în diplo sau grămezi, necapsulate, nesporulate, neciliate, Gram-variabile. Este o bacterie aerobă şi saprofită, cantonată în sol, în special în cel îngrăşat cu îngrăşăminte organice (uree).

♦ Dacă celulele rezultate în urma diviziunii rămân ataşate

câte două, în perechi, formează diplococi (*Diplococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* şi *Neisseria gonorrhoeae*).

♦ Dacă tendinţa de ataşare a celulelor este mai pronunţată se formează lanţuri mai lungi sau mai scurte de coci, constituind forma de streptococ (*Streptococcus pyogenes*).

♦ În urma unei diviziuni după două planuri perpendiculare între ele, celulele surori rămân ataşate câte patru, formând tetrade (*Gafkia tetragena*). *Gafkia tetragena* (tetragenul) prezintă celule în formă de coc, adesea încapsulate, cu o dispoziţie caracteristică în tetrade. În general lipsit de patogenitate este întâlnit ca saprofit în căile aeriene superioare. Ca germene de asociaţie poate fi observat în diferite afecţiuni respiratorii.

♦ Diviziunea cocilor poate avea loc după trei planuri perpendiculare, rezultând pachete cubice de coci numite sarcine (*Sarcina lutea*). *Sarcina lutea* are formă de coci sferici, cu dispoziţia caracteristică genului, în pachete cubice, imobili, nesporulaţi, necapsulaţi, Gram- pozitivi. Este o bacterie saprofită, răspândită în aer, sol şi apă.

♦ Atunci când diviziunea se face după mai multe planuri neordonate, celulele se dispun sub formă de ciorchine, alcătuind stafilococul (*Staphylococcus aureus*).

2. TIPUL BACILAR - din acest tip morfologic fac parte bacterii cilindrice, sub formă de bastonaşe cu diametrul longitudinal de câteva ori mai mare decât cel transversal. Forma bacililor prezintă unele variaţii care se referă la marginile şi extremităţile celulelor.

Marginile pot fi paralele sau sunt depărtate la una sau ambele extremităţi dând aspectul de măciucă, de halteră aşa cum întâlnim la *Corynebacterium diphtheriae*. Lungimea corpului acestei bacterii variază între 2-8 μm şi lăţimea între 0,5-1 μm. Este drept sau uşor curbat. Se aşază mai rar în palisade, obişnuit formează unghiuri între ei, desenând litere din alfabet (L, M, N, V). Este Gram-pozitiv la limită, adică decolorarea mai insistentă face ca să piardă culoarea violet, devenind mov sau roz, este nesporulat, necapsulat şi imobil. Bacilul difteric se localizează la om pe mucoasa rinofaringiană, fiind tipul clasic de bacterie patogenă care rămâne cantonată la poarta de intrare în organism. Este agentul cauzal al amigdalitei, laringitei şi rinitei difterice.

La majoritatea bacililor extremităţile sunt rotunjite, marginile paralele, corpul uşor curbat (*Mycobacterium tuberculosis*).

Bacilul tuberculos sau bacilul Koch se prezintă sub formă de bastonaş cu lungimea de 1-4 μm şi 0,3-0,6 μm grosime, de formă neregulată, uneori ramificat. Poate apărea fie izolat, fie alipit, adesea reunit în grămezi mici, în care corpii microbieni formează figuri în L, X, V. Este imobil, nesporulat, necapsulat, alcooloacidorezistent. *Mycobacterium tuberculosis* este un parazit obligatoriu, de aceea nu trăieşte liber în natură, în afara gazdelor pe care le parazitează. Din această cauză, la om contaminarea este aproape totdeauna interumană. Este agentul etiologic al tuberculozei.

Unii bacili prezintă corpul rectiliniu, marginile paralele şi capetele tăiate drept. Este cazul întâlnit la *Bacillus anthracis*. Bacilul cărbunos este o bacterie de 5-10 μm lungime şi 1-3 μm grosime, imobil, capsulat şi sporulat. În produsele patologice formează lanţuri

scurte (aspect de trestie de bambus) şi nu prezintă spori. În culturi formează lanţuri lungi. Capsula este sintetizată numai în mediu bogat în albumine sau bicarbonat şi în atmosferă de CO_2 (20%). În aerobioză formează spori ovoizi, centrali şi nedeformanţi. ***Bacillus anthracis*** este o bacterie patogenă, întâlnită mai ales în solul de păşune. Este agentul patogen al bolii numite antrax (dalac sau cărbune), boală întâlnită la animalele ierbivore şi la om.

Bacilii pot fi grupaţi în diplo - diplobacili sau lanţuri - streptobacili. Unii se dispun sub formă de palisadă ori pachete de ace cu gămălie (***Corynebacterium diphtheriae***), iar alţii formează grupări caracteristice de rozetă sau stea (***Agrobacterium stellatum***).

3. TIPUL SPIRALAT - cuprinde bacterii cilindrice, alungite, dar care prezintă curburi ale axului longitudinal. Se deosebesc 3 subtipuri:

a) Vibrionul, bacterie în formă de virgulă (***Vibrio cholerae***). Morfologia vibrionului holeric este variabilă, funcţie de habitat. În intestin se pot întâlni de la forme cocoide până la forme filamentoase, ceea ce îi face deseori greu de identificat. În culturi, vibrionii pot să se înfăţişeze de la forme granulare până la forme lungi. Este extrem de mobil, poate cel mai mobil dintre toţi germenii patogeni cunoscuţi. Mobilitatea este datorită unui cil mic, de 2-3 ori mai lung decât vibrionul, situat la una din extremităţile sale. Este nesporulat şi necapsulat. Este Gram-negativ. Omul este singura gazdă a vibrionului holeric. În anumite condiţii poate fi întâlnit în apă şi sol. Este agentul etiologic al holerei.

b) Spirilul, în formă de spirală rigidă (*Spirillum volutans*). *Spirillum volutans* prezintă lungimea corpului de 13-14 μm, cu un diametru de 1,5 μm, având ambele extremităţi ascuţite. În citoplasmă se observă granulele de volutină de culoare închisă. Este mobil, prezentând la fiecare pol câte un smoc de 15 flageli; este Gram-negativ. *Spirillum volutans* este o bacterie saprofită, întâlnită în apele stagnante.

c) Spirocheta - prezintă corpul în formă de spirală, cu mai multe ture de spiră, dar flexibile.

Spirochetele saprofite se întâlnesc în cavităţile naturale ale omului şi animalelor, în apă şi solul umed. Spirochetele patogene se găsesc în organismul uman (*Treponema, Borrelia, Leptospira*) sau în organismul animalelor şi insectelor (*Treponema cuniculi*, diferite specii de *Borrelia*).

Spirochetele patogene au lungimea de 2-50 μm. Citoplasma este helicoidală, răsucită pe un filament axial(*Leptospira*) sau pe un grup de filamente axiale (*Borrelia* şi *Treponema*) fiind învelită de memebrana celulară. Spirochetele se colorează atât prin metode speciale (metoda Giemsa şi impregnare argentică), cât şi cu soluţii apoase din coloranţii de anilină. În preparate proaspete, spirochetele, vizibile la microscopul cu fond întunecat, sunt mobile, prezentând mişcări vii de rotaţie, flexie şi translaţie.

În afară de aceste tipuri morfologice fundamentale, există un tip morfologic intermediar, între tipul cocoid şi bacilar, numit tip **cocobacilar**. La acesta, raportul celor două diametre ale celulei se apropie de unitate.

BCU IAŞI

4. TIPUL FILAMENTOS - aceste bacterii au ca prototip actinomicetele, microorganisme cu asemănări morfologice izbitoare cu fungii, având particularitatea de a forma hife cu tendinţe de ramificare, de unde şi aspectul lor micelian.

5. TIPUL PĂTRAT - bacterii evidenţiate în apa hipersalină din unele bălţi din Peninsula Sinai, au forma unor pătrate cu latura de 1,5-11 μm. Au fost încadrate în genul *Quadra*, aparţinând, probabil, grupului *Archaebacteria*.

În afara acestor 5 tipuri morfologice de bază există bacterii cu forme particulare, rezultând din gruparea lor într-un trichom, prezenţa unor prelungiri celulare (prosteca), a unor apendice acelulare etc.

7.2. DIMENSIUNILE BACTERIILOR

În general dimensiunile bacteriilor sunt de ordinul micronilor, din care cauză nu pot fi observate cu ochiul liber.

Dimensiunile cocilor variază între 0,2-2 μm.

Dimensiunile bacililor variază între 0,3-2 μm diametrul transversal şi 0,5-10 μm diametrul longitudinal.

Dimensiunile spirililor şi spirochetelor variază între 0,25-3,5 μm diametrul transversal şi 6-100 μm diametrul longitudinal.

În culturi vechi, sub acţiunea nefavorabilă a agenţilor fizici, chimici sau biologici, dimensiunile bacteriilor pot creşte foarte mult obţinându-se forme filamentoase, lungi de peste 100 μm sau forme globuloase cu diametrul de 5-10 μm.

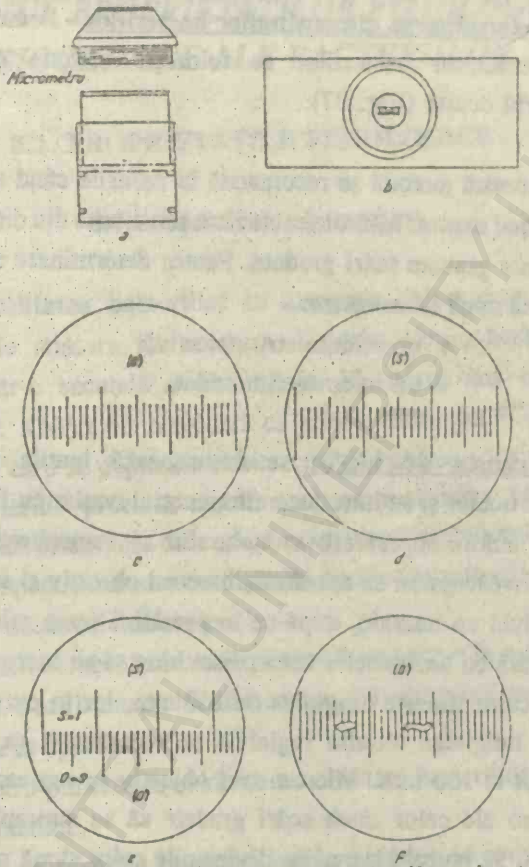


Fig. 27. Determinarea dimensiunilor bacteriilor: a. introducerea micrometrului în sistemul ocular al microscopului; b. micrometru obiectiv; c. imaginea microscopică a micrometrului ocular; d. imaginea microscopică a micrometrului obiectiv; e. imaginea suprapusă a celor două micrometre; f. determinarea dimensiunilor unei celule bacteriene.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Determinarea dimensiunilor bacteriilor - Pentru determinarea dimensiunilor bacteriilor se foloseşte metoda măsurării cu micrometrul ocular (Fig. 27).

Această metodă se recomandă în cazurile când sunt necesare aprecieri mai exacte. Micrometrele sunt constituite din discuri de sticlă pe care sunt gravate scări gradate. Pentru determinare sunt necesare întotdeauna două micrometre:

- un micrometru obiectiv;
- un micrometru ocular.

Tehnica de lucru: se deşurubează lentila superioară a sistemului ocular şi se introduce micrometrul ocular cu faţa gravată în jos, apoi lentila superioară a ocularului se înşurubează la loc. Pe platina microscopului se aşază micrometrul obiectiv şi se examinează cu obiectivul cu imersie, după ce în prealabil scara micrometrului a fost centrată cu un obiectiv uscat. Este bine să se lucreze cu microscoape al căror tub are lungimea de 160 mm, iar în cazul microscoapelor cu lungimea tubului reglabilă se recomandă ca acesta să se regleze tot la 160 mm. Micrometrul obiectiv se reglează astfel încât liniile zero ale celor două scări gradate să se suprapună. Apoi se observă şi se notează care din diviziunile celor două micrometre se suprapun. Valorile găsite la micrometrul obiectiv se înmulţesc cu 10 (valoarea în μ a unei diviziuni) şi se împart apoi la valorile corespunzătoare de pe scara micrometrului ocular. Cifra obţinută reprezintă valoarea micrometrică a unei diviziuni din scara gradată a micrometrului ocular.

8. STUDIUL PROPRIETĂŢILOR FIZIOLOGICE ŞI BIOCHIMICE ALE BACTERIILOR

8.1. PROPRIETĂŢILE FIZIOLOGICE

8.1.1. Mobilitatea bacteriilor

Mobilitatea bacteriilor se datoreşte cililor care reprezintă organitele de mişcare ale acestora. Datorită lor, o bacterie poate parcurge într-o secundă o distanţă de 10-12 ori mai mare decât lungimea ei. KNAYAL consideră că aceste viteze pot fi depăşite de unele specii care se deplasează chiar cu 0,2 mm/sec.

Bacteriile prezintă mobilitatea cea mai mare în condiţiile optime de dezvoltare, din care cauză examinarea mobilităţii lor trebuie să se facă respectând aceste condiţii. Bacteriile din culturile tinere sunt mai mobile decât cele din culturile vechi.

Bacilii aerobi, în momentul transformării lor în spori îşi pierd mobilitatea. Bacilii anaerobi, din contra, îşi păstrează mobilitatea şi după formarea sporilor.

Pentru punerea în evidenţă a mobilităţii bacteriilor se folosesc mai multe metode.

Metoda însămânţării în lichidul de condensare. Se execută însămânţarea cu ansa într-un tub cu geloză înclinată, în lichidul de condensare de la fundul tubului, ferind atingerea mediului cu ansa în alte porţiuni. Se incubează mediul însămânţat timp de 24 ore la 37°C. O bacterie imobilă nu se dezvoltă în acest caz decât la fundul tubului. Bacteriile mobile invadează mediul acoperindu-l uneori

în întregime.

Această metodă este aplicabilă numai în cazul bacteriilor foarte mobile, ca cele din genul *Proteus* sau unele specii de *Bacillus*.

Metoda cultivării în medii semisolide. Dacă se însămânţează prin înţepare o bacterie imobilă în agar moale, ea se dezvoltă numai de-a lungul liniei parcurse de ansă, restul mediului rămânând limpede. În aceleaşi condiţii de lucru, o bacterie mobilă invadează întreaga masă a mediului, opacifiindu-l uniform.

Metoda tubului în U (după Vahlne) sau metoda transmigraţiei. Se confecţionează tuburi de sticlă în formă de U din sticlă fuzibilă cu diametrul de 5-6 mm. Lungimea unei ramuri trebuie să fie aproximativ 8-10 cm. În aceste tuburi se repartizează un mediu de cultură (agar nutritiv 0,2-0,4%). Mediul ajunge în ambele ramuri ale tubului la jumătatea înălţimii acestora. Ambele extremităţi se astupă cu dopuri de vată, după care se autoclavează. După solidificarea mediului într-una din ramurile tubului se însămânţează prin înţepare tulpina bacteriană de examinat. Tuburile însămânţate se incubează la termostat la 37°C, urmărindu-se din timp în timp. Speciile bacteriene imobile se dezvoltă numai în ramura în care s-a făcut însămânţarea de-a lungul liniei de însămânţare, în timp ce bacteriile mobile difuzează în toată masa mediului, producând o turbiditate a acestuia, invadându-l până la suprafaţa ramurii opuse (Fig.28).

În afara acestor metode directe de punere în evidenţă a mobilităţii, mai există şi metode indirecte dintre care menţionăm:

- metoda examenului în picătură suspendată;
- metoda examenului între lamă şi lamelă.

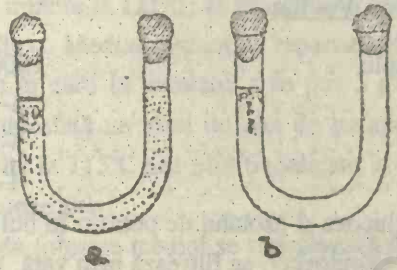


Fig. 28. Examenul mobilităţii prin folosirea tuburilor în formă de U: a) bacterie mobilă; b) bacterie imobilă.

8.1.2. Metode de cultivare a bacteriilor în anaerobioză

Bacteriile prezintă variaţii considerabile în ceea ce priveşte necesitatea de oxigen, deosebindu-se din acest punct de vedere bacterii aerobe, anaerobe şi facultativ anaerobe.

Însămânţate într-un mediu solid sau semisolid în coloană, se vor dezvolta la nivele diferite: cele aerobe la suprafaţă, cele anaerobe în profunzime, iar bacteriile facultativ anaerobe în toată coloana mediului.

Pentru cultivarea bacteriilor anaerobe este necesar să se împiedice pătrunderea aerului în mediul în care se dezvoltă.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Medii pentru cultivarea bacteriilor anaerobe

Geloza Veillon

Bulion simplu	1000 ml
Agar	8-10 g
Glucoză	5-10 g
KNO_3	1-2 g

Se dizolvă glucoza şi azotatul de potasiu în bulion, se adaugă agarul, se încălzeşte la autoclav, se filtrează prin vată, se repartizează în tuburi Weinberg, astfel ca mediul să ocupe mai mult de jumătate din înălţimea tubului. Se sterilizează la 115°C, timp de 15 minute. Pentru solidificarea mediului, tubul se menţine în poziţie verticală.

Bulion cu ficat (bulion Tarozzi). Se fierbe ficatul (de cal, bou, cobai, iepure), se taie în fragmente de formă paralelipipedică. Se introduc în tuburi cu 8-10 ml bulion simplu sau bulion glucozat 1%. Se sterilizează la 110°C, timp de 20 minute.

Bulion VF (viande = carne, foie = ficat - fr.)

Ficat de bou	250 g
Carne de bou	250 g
Apă de robinet	1000 ml

Ficatul şi carnea se toacă mărunt şi se fierb 20 minute. Se filtrează prin tifon. Fragmentele de carne şi ficat rămase în tifon se spală de 4-5 ori cu apă distilată, se usucă şi se repartizează în tuburi 1-3 g. Lichidul obţinut după filtrare se completează la volumul iniţial

adăugându-se apă de robinet. Se adaugă peptonă 5 g şi NaCl 5 g. Se încălzeşte pentru dizolvarea ingredientelor, se ajustează la pH = 8, se autoclavează 20 minute la 121°C, se adaugă glucoză 2% şi se filtrează prin hârtie de filtru. Mediul obţinut se repartizează aproximativ câte 6 ml în tuburile în care în prealabil s-au pus 3 g carne cu ficat. Se poate pune la suprafaţă un strat de ulei de parafină. Se sterilizează timp de 15 minute la 115°C sau prin tindalizare la 100°C, timp de 30 minute, 3 zile consecutiv.

Înainte de folosire mediul se regenerează prin fierbere.

Mediile lichide sau solide pentru bacteriile anaerobe, imediat după sterilizare prin fierbere sau autoclavare, nu conţin aer şi pot fi însămânţate cu germeni anaerobi. Pentru a împiedica pătrunderea oxigenului în mediile lichide însămânţate, tubul se închide ermetic sau suprafaţa mediului se acoperă cu ulei de parafină. Oxigenul dizolvat în mediul lichid se poate îndepărta prin adăugarea unor substanţe chimice sau produse biologice cu proprietăţi reducătoare. Acelaşi rezultat se obţine şi prin introducerea de porţiuni de ţesuturi vegetale sau animale: felii de morcov, de cartofi, fragmente de muşchi, rinichi, creier etc. Acestea au o acţiune reducătoare datorită în mare parte conţinutului în cisteină. Mediile lichide uzuale anaerobe, la suprafaţa cărora nu s-a adăugat un strat izolant de ulei de parafină, trebuie să fie regenerate înainte de însămânţare. Regenerarea constă în fierberea mediilor timp de 10 minute într-o baie de apă şi are ca scop eliminarea oxigenului care s-a acumulat între timp în mediu.

Operaţia de însămânţare se execută la fel ca pentru bacteriile aerobe, cu unele deosebiri: geloza Veillon se însămânţează în stare lichefiată şi răcită la 45°C. După însămânţare, tubul se agită prin

rulare între palme, pentru răspândirea uniformă a inoculului în masa mediului, având grijă să nu se formeze bule de aer. Apoi mediul se solidifică brusc prin introducerea tubului într-un vas cu apă rece. Mediile însămânţate se notează şi se incubează la 37°C.

În mediile solide pătrunderea oxigenului este împiedicată prin repartizarea mediului în tuburi înguste şi înalte, astfel ca să se obţină o coloană cât mai subţire. Microorganismele anaerobe se dezvoltă în straturile profunde ale mediului.

Anaerobioza se poate obţine şi prin alte procedee, cum ar fi îndepărtarea aerului dintr-un spaţiu ermetic închis. Aceasta se poate realiza prin diferite metode: fizice, chimice şi biologice.

Metodele fizice constau în extragerea aerului cu o pompă de vid dintr-un recipient ermetic închis (anaerostat). În acest vas se reuşeşte să se cultive bacterii strict anaerobe, pe suprafaţa agarului în plăci Petri. Aerul atmosferic extras cu pompe de vid poate fi înlocuit cu azot sau hidrogen.

Metodele chimice se bazează pe faptul că unele combinaţii chimice au loc cu consum de oxigen. Se folosesc mai multe tehnici:

a) Mediile însămânţate se introduc într-un exicator în care se pun substanţe chimice ca: acid pirogalic şi KOH (1 ml pirogalol 20% şi 1 ml KOH soluţie saturată). Reacţia dintre cele două substanţe asigură absorbţia unui volum de 44 cm^3 oxigen care se găsesc în 220 cm^3 aer.

b) Materialul se însămânţează pe suprafaţa unei plăci Petri. Pe capacul plăcii se fixează cu leucoplast un plic cu următorul amestec: pirogalol 1 g, K_2CO_3 1 g, chiselgur 5 g. Amestecul se repatizează în

plicuri câte 2 g. După fixarea plicului, placa se închide, etanşând cele două capace cu o bandă adezivă. Plăcile se incubează la termostat la 37°C.

c) Folosirea de medii în care se introduc substanţe reducătoare ca: tioglicolat, cisteină, acid ascorbic care menţin un potenţial oxido-reducător scăzut, creând astfel condiţii de anaerobioză.

Compoziţia mediului cu tioglicolat:

Extract de drojdii bacto	5 g
Hidrolizat triptic de cazeină	15 g
Dextroză	5 ml
NaCl	2,5 g
L-cisteină	0,75 g
Acid tioglicolic	0,3 g
Agar	0,75 g
Resazurin	0,001 g
Apă distilată	1000 ml

pH = 7,1

Mediul se repartizează în eprubete câte 15 ml, cantitate care conferă raportul cel mai bun între volum şi suprafaţă, necesar dezvoltării tuturor microorganismelor. Se autoclavează la 121°C timp de 20 minute după care se răceşte brusc la 25°C. Se însămânţează imediat sau se păstrează la 20-30°C, la întuneric. Însămânţarea se face cu ansa prin înţepare. Eprubetele se introduc apoi în termostat la 28°C sau 37°C timp de 24-48 ore. După acest interval de timp se fac observaţiile.

Dacă cultura bacteriană se dezvoltă la suprafaţa mediului,

bacteria este aerobă (*Bacillus subtilis*); când cultura bacteriană se dezvoltă în toată masa mediului, bacteria este aerobă facultativ anaerobă (*Staphylococcus aureus*); dacă cultura se dezvoltă numai pe fundul mediului. bacteria este anaerobă (*Clostridium tetani*); în cazul în care bacteria este microaerofilă (*Corynebacterium diphtheriae*), cultura se dezvoltă în zona plasată imediat sub suprafaţa mediului de cultură, adică în porţiunea în care oxigenul mai pătrunde prin difuziune (Fig. 29).

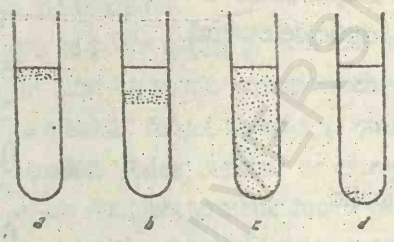


Fig. 29. Creşterea bacteriilor în mediul cu tioglicolat în funcţie de necesităţile lor de oxigen: a) aerobă; b) microaerofilă; c) facultativ anaerobă; d) anaerobă.

Metodele biolgice au fost imaginate de FORTNER şi constau în cultivarea într-un spaţiu închis a unei specii bacteriene aerobe împreună cu una anaerobă.

8.2. PROPRIETĂŢILE BIOCHIMICE ALE BACTERIILOR

Punerea în evidenţă a caracterelor biochimice ale bacteriilor constau în evidenţierea echipamentului enzimatic al acestora, diferit de

la o specie la alta, prin aşa numitele *"reacţii"* sau *"teste biochimice"*. Pentru executarea lor se folosesc medii care conţin substraturile faţă de care se impune investigarea activităţii enzimatice.

Punerea în evidenţă a enzimelor bacteriene prin teste biochimice se rezumă la două categorii de metode mai importante:

♦ metode prin care se urmăreşte în mod direct acţiunea bacteriei asupra unui substrat, caz în care se observă însăşi modificarea fizică sau chimică a substratului (ex. lichefierea gelatinei, lichefierea serului coagulat);

♦ metode prin care se pun în evidenţă, cu ajutorul diferiţilor reactivi, metaboliţii rezultaţi din scindarea substratului sub acţiunea enzimelor bacteriene.

8.2.1. Evidenţierea capacităţii de utilizare a glucidelor

Numeroase specii bacteriene au proprietatea de a descompune glucidele cu formare de aldehide, acizi şi gaze (CO_2, H_2, CH_4).

Pentru a pune în evidenţă această proprietate, bacteriile se cultivă pe medii solide sau lichide la care se adaugă glucidele respective şi un indicator al reacţiei mediului.

Glucidele mai des folosite pentru cercetarea caracterelor fermentative ale bacteriilor sunt:

♦ **Monozaharide:**

- pentoze:
  * arabinoză;
  * xiloză;

* ramnoză;

- hexoze:

* glucoză;

♦ **Dizaharide:**

- zaharoză;
- maltoză;
- lactoză;
- celobioză;

♦ **Polizaharide:**

- amidon;
- celuloză;

♦ **Alcooli:**

- pentavalenţi:

* adonitol;

- hexavalenţi:

* manitol;
* dulcitol;
* sorbitol;

♦ **Glucozide:**

- salicina;

♦ **Cicloze:**

- inozitol.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

8.2.1.1. Examinarea proprietăţilor zaharolitice în apă peptonată cu albastru bromtimol

Material necesar:

- Apă peptonată (vezi cap. 3.2.1.). Se repartizează în eprubete câte 9 ml şi se sterilizează la autoclav la 121°C, timp de 20 minute.
- Soluţii de glucide sterile 10% (glucoză, zaharoză, lactoză); sterilizarea se efectuează prin tindalizare.
- Indicator de pH - soluţie de albastru de bromtimol (1 g albastru de bromtimol + 25 ml NaOH 0,1 N + 475 ml apă distilată).
- Culturi bacteriene de testat.

Tehnica de lucru:

Cu o pipetă sterilă se adaugă în fiecare eprubetă cu apă peptonată sterilă, câte 1 ml soluţie de glucid 10%, realizându-se astfel concentraţia finală a glucidelor de 1%.

Însămânţarea tulpinilor de cercetat se face cu ansa, din cultura pe agar în vârstă de 18-20 ore. După incubare (24-48 ore) la termostat la temperatura de 28°C sau 37°C, în fiecare eprubetă se adaugă câte 0,5 ml indicator. Dispariţia culorii albastre indică metabolizarea glucidelor adăugate. Atunci când reacţia se urmăreşte un timp mai îndelungat (7 zile) este indicat ca albastrul de bromtimol să se adauge înainte de sterilizarea mediului.

Unele bacterii pot fermenta glucidele cu producere de gaz.

Acest caracter se evidenţiază tot în mediu lichid în care se introduc tuburi Durham (Fig. 30).

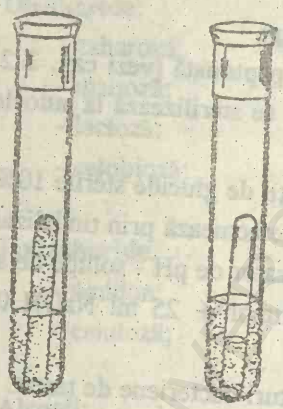


Fig. 30. Evidenţierea fermentării glucidelor.

8.2.1.2. Testul de hidroliză a amidonului

Material necesar:

- Mediu nutritiv - geloză care conţine 1% amidon solubil;
- Soluţie Lugol sau soluţie saturată de iod (20 g iod în 100 ml alcool etilic 90°);
- Culturi bacteriene de testat.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica de lucru:

Se lichefiază mediul pe o baie de apă şi se toarnă în plăci Petri sterile. După solidificare se însămânţează cu bacteria de testat. Se incubează plăcile la termostat la temperatura de 28°C şi 37°C timp de 24-48 ore. După dezvoltarea culturii, suprafaţa mediului se acoperă cu soluţie Lugol. Mediul se colorează în albastru violaceu datorită prezenţei amidonului, cu excepţia zonelor de mediu din jurul coloniilor bacteriene care au hidrolizat amidonul şi rămân incolore. În aceste zone a avut loc hidroliza amidonului sub acţiunea amilazei eliminate în mediu.

8.2.2. Evidenţierea proprietăţiior proteolitice

Proprietatea bacteriilor de a descompune substanţele proteice se poate pune în evidenţă prin mai multe teste.

8.2.2.1. Testul de hidroliză a cazeinei

Material necesar:

- Mediu nutritiv - geloză care conţine 1% cazeină;
- Culturi bacteriene de testat.

Tehnica de lucru:

Se lichefiază mediul pe o baie de apă şi se toarnă în plăci Petri sterile. După solidificare se însămânţează cu bacteriile de testat. Plăcile se incubează la termostat la temperatura de 28°C sau 37°C, timp de 24-48 ore. Dacă bacteriile prezintă proprietăţi proteolitice,

cazeina, sub acţiunea proteazei se peptonizează iar mediul din jurul coloniilor se clarifică.

8.2.2.2. Testul de gelatinoliză

Tehnica de lucru: se prepară mediul cu gelatină (vezi cap. 3.2.1.).

Material necesar: mediul preparat se repartizează câte 10 ml în eprubete şi se sterilizează la 115°C timp de 20 minute. Se lasă să se solidifice în poziţie verticală. Mediul se însămânţează cu bacteriile de studiat prin înţepare drept în centrul coloanei, astfel ca să se ajungă până la fundul tubului. Culturile se aşază în poziţie verticală la termostat la temperatura 20-22°C. Durata incubării este de 12 zile. În acest interval de timp se urmăreşte creşterea bacteriilor testate şi gradul de lichefiere a gelatinei. Poate avea loc creşterea fără lichefiere sau creşterea cu lichefiere în care caz deosebim diferite aspecte (Fig. 17). Citirea se face, în general, de trei ori; prima zi, a zecea şi a douăsprezecea zi. Dacă bacteriile de testat nu se dezvoltă la 20°C pot fi cultivate în gelatină la 37°C. În acest caz, pentru citirea rezultatelor, eprubetele se răcesc, introducându-se în frigider şi notându-se apoi gradul de lichefiere în comparaţie cu mediul neînsămânţat.

8.2.2.3. Testul de lichefiere a serului coagulat

Material necesar: ser de bou sau iepure; bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru: serul recoltat în mod steril se repartizează în eprubete sterile. Eprubetele se aşază în poziţie înclinată în coagulator la temperatura de 70-75°C pentru coagulare. După coagulare, mediul capătă o culoare alb-cenuşie. Bacteriile de studiat se însămânţează pe suprafaţa mediului. Se urmăreşte lichefierea sau formarea depresiunilor pe suprafaţa mediului, în dreptul coloniilor.

8.2.2.4. Testul de hemoliză

Material necesar:

- geloză simplă;
- sânge de ovine defibrinat;
- cutii Petri şi pipete gradate sterile;
- bacteriile de testat.

Tehnica de lucru:

Eprubetele cu mediu (20 ml geloză în fiecare eprubetă) se lichefiază pe baia de apă. Se răcesc apoi la 45-50°C şi se adaugă 2 ml sânge defibrinat. După o uşoară omogenizare se toarnă amestecul într-o cutie Petri. După solidificarea mediului, acesta se însămânţează pe suprafaţa cu bacteriile de testat. Incubarea se face la 37°C timp de 48 ore. În urma creşterii pe mediu cu sânge, bacteriile pot produce următoarele aspecte:

- dezvoltarea însoţită de decolorarea şi clarificarea mediului în jurul coloniilor, modificare care corespunde unui proces de hemoliză şi hemodigestie; mărimea zonei de hemoliză din jurul coloniilor este în funcţie de cantitatea de hemolizine secretată de bacterii şi de gradul lor de activitate;

◆ dezvoltarea însoţită de colorarea în verde a mediului în dreptul şi în jurul coloniilor, această modificare corespunde transformării hemoglobinei în methemoglobină sub acţiunea apei oxigenate produse de bacterii (efect viridans sau hemoliză alfa);

◆ dezvoltarea fără schimbarea aspectului mediului (bacterii nehemolitice sau hemoliză gamma.

8.2.3. Evidenţierea produşilor rezultaţi din descompunerea aminoacizilor

8.2.3.1. Evidenţierea producerii de hidrogen sulfurat

Hidrogenul sulfurat este un produs rezultat din scindarea aminoacizilor care conţin sulf (cisteină, cistină etc.) sub acţiunea unor enzime bacteriene. Producerea de hidrogen sulfurat se pune în evidenţă prin mai multe metode.

Metoda cultivării pe mediu cu acetat de plumb

<u>Material necesar</u>:

◆ mediu nutritiv - geloză;

◆ $(CH_3\text{-}COO)_2Pb$;

◆ bacteriile de testat.

<u>Tehnica de lucru</u>:

La 1000 ml mediu gelozat se adaugă 1 g de acetat de plumb. Mediul se repartizează în eprubete şi se sterilizează 20 minute la

121°C. Se însămânţează apoi pe suprafaţa mediului bacteriile de testat.

Dacă bacteria produce H_2S, mediul se înnegreşte în jurul coloniei, datorită sulfurii de plumb care rezultă din combinarea H_2S şi a acetatului de plumb, conform reacţiei:

$$(CH_3\text{-}COO)_2Pb + H_2S \longrightarrow PbS + 2\ CH_3\text{-}COOH$$

Metoda benzilor cu acetat de plumb

Material necesar:

- mediu nutritiv - bulion de carne;
- benzi de hârtie de filtru lungi de 5-6 cm, late de 1 cm, îmbibate cu o soluţie de 10% acetat de plumb. Se usucă şi se introduc în eprubete care se sterilizează la autoclav.

Tehnica de lucru:

Se repatizează mediul nutritiv în eprubete şi se sterilizează la autoclav 20 minute la 121°C. După răcire se însămânţează cu bacteria de testat. Apoi se introduc în eprubete benzile de hârtie, fixându-se cu dopul de vată, la aproximativ 1 cm de la suprafaţa mediului. Dacă bacteria produce hidrogen sulfurat, banda se înnegreşte în porţiunea inferioară după 24 ore sau mai multe zile de incubare la 37°C.

8.2.3.2. Punerea în evidenţă a indolului

Unele bacterii cultivate în bulion sau apă peptonată au proprietatea de a scinda triptofanul. Triptofanaza oxidează lanţul

lateral al triptofanului rezultând indolul, conform reacţiei:

Material necesar:

- mediu nutritiv - apă peptonată;
- reactiv Kovacs:
  - * p-dimetilaminobenzaldehidă 5 g;
  - * alcool amilic 75%;
  - * acid clorhidric conc. 25 ml.

Se cântăresc 5 g p-dimetilaminobenzaldehidă care se dizolvă în 75 ml alcool amilic, după care se adaugă cu grijă 25 ml acid clorhidric conc.

Tehnica de lucru:

Se repartizează câte 10 ml de apă peptonată în eprubete care se sterilizează la autoclav. Se însămânţează apoi bacteriile de testat incubându-se 48 ore la 37 sau 28°C. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte 3-5 picături de reactiv Kovacs. Se agită eprubetele uşor, lăsându-se apoi în repaus 5 minute.

În tuburile pozitive, la suprafaţa lor va apare un inel de culoare roşie-vişinie.

8.2.4. Testul de hidroliză a ureei

Numeroase bacterii au capacitatea de a hidroliza ureea sub acţiunea ureazei, conform reacţiei:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Material necesar:

♦ **Mediul Christensen:**

glucoză	1	g
peptonă	1	g
NaCl	5	g
KH_2PO_4	2	g
roşu fenol	0,012	g
agar	15	g
apă distilată	1.000	ml

pH = 6,8

♦ soluţie uree 20%, sterilizată prin filtrare sau tindalizare;

♦ bacterii de testat.

Tehnica de lucru:

Mediul se repartizează câte 5 ml în eprubete şi se sterilizează la autoclav la 110°C, 20 minute. Înainte de folosire se lichefiază, se aduce la temperatura de 50°C şi se adaugă cu pipeta sterilă câte 0,2 ml soluţie uree 20%. Eprubetele se lasă să se răcească în poziţie înclinată. Datorită reacţiei slab acide, mediul are culoare alb-gălbuie.

În urma însămânţării unei bacterii care hidrolizează ureea, mediul iniţial galben se colorează în roşu, datorită virării roşului fenol în prezenţa amoniacului, metabolit rezultat din descompunerea ureei.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

8.2.5. Evidenţierea proprietăţilor reducătoare ale bacteriilor

Punerea în evidenţă a proprietătilor reducătoare ale bacteriilor se face prin mai multe metode.

8.2.5.1. Reacţia de reducere a nitraţilor în nitriţi (testul de denitrificare)

Unele bacterii au proprietatea de a reduce nitraţii în nitriţi prin enzimele ce le posedă.

Material necesar:

- Mediu nutritiv;
- Reactivul Griess-Hosvay;
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru:

Mediul nutritiv are următoare compoziţie:

peptonă	10 g
KNO_3	10 g
apă distilată	1.000 ml

Mediul se încălzeşte la flacără pentru dizolvarea ingredientelor. Apoi se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în eprubete câte 10 ml şi se sterilizează prin tindalizare. Se însămânţează bacteriile de studiat şi se incubează la 28 sau 37°C, timp de 3-5 zile. După acest interval se controlează reducerea nitraţilor în nitriţi cu ajutorul

reactivului Griess-Hosvay. Acest reactiv se compune din două soluţii:

Soluţia I:

α-naftilamină . . . . . 1 g
apă distilată . . . . . 22 g

Se încălzeşte, se filtrează şi se adaugă 1 ml acid acetic glacial diluat (400 ml în 700 ml apă distilată).

Soluţia II:

acid sulfanilic . . . . . 0,5 g
acid acetic diluat . . . . . 150 ml

În fiecare eprubetă se adaugă câte 5 picături din soluţia I şi 5 picături din soluţia II.

În cazul reacţiei pozitive, după adăugarea celor două soluţii, mediul se colorează în roşu; dacă nu a avut loc reducerea, mediul nu-şi modifică culoarea.

8.2.5.2. Reacţia Voges-Proskauer (reacţia acetil-metil-carbinol)

Acetil-metil-carbinolul este un metabolit rezultat din descompunerea de către bacterii a 2,3-butilen-glicocolului. Acetil-metil-carbinolul, în prezenţa alcanilor şi a oxigenului atmosferic este oxidat în diacetil care împreună cu peptona din mediu produce o culoare roz fluorescentă.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Material necesar:

- Mediu Clark şi Lubs;
- KOH, soluţie 10%;
- $FeCl_3$, soluţie 2%;
- bacterii de studiat.

Tehnica de lucru:

Mediul Clark şi Lubs are următoarea compoziţie:

peptonă	5 g
glucoză	5 g
K_2HPO_4	3 g
apă distilată	800 ml

Ingredientele se dizolvă prin încălzire la 100°C, 20 minute. Se filtrează şi se aduce la volumul de 1 000 ml cu apă distilată. Se repartizează câte 5 ml în eprubete, sterilizându-se trei zile consecutiv la 100°C, 30 minute. Se însămânţează cu bacteriile de studiat. Supă 48 ore de incubare la 28°C sau 37°C se adaugă în fiecare eprubetă câte 5 ml KOH 10%. Citirea reacţiei se face după 24 ore de incubare la 28 sau 37°C dacă se adaugă o picătură de $FeCl_3$, 2%, înainte de adăugarea KOH 10%, se accelerează reacţia, citirea putând fi făcută după o oră de incubare.

8.2.5.3. Reacţia roşu de metil

Această reacţie serveşte la determinarea concentraţiei ionilor de hidrogen, într-un mediu glucozat şi fosfat, produsă de bacterii în cursul procesului de fermentare a glucozei.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Material necesar:

- mediul Clark şi Lubs;
- roşu de metil (0,1 g roşu de metil + 300 ml etanol 96° + 200 ml apă distilată);
- bacteriile de testat.

Tehnica de lucru:

Se prepară mediul Clark şi Lubs şi se repartizează câte 5 ml în eprubete. Se sterilizează prin tindalizare. Se însămânţează bacteriile de studiat. După incubare, 3-4 zile la 28°C sau 37°C, se adaugă 5 picături de soluţie de roşu de metil. Apariţia unei coloraţii roz sau roşii indică o reacţie pozitivă (o concentraţie ridicată de ioni de hidrogen).

8.2.5.4. Evidenţierea catalazei

Material necesar:

- mediul nutritiv;
- H_2O_2 3%;
- soluţie de săpun 10%;
- culturi bacteriene.

Tehnica de lucru:

Eprubetele cu mediu nutritiv (5 ml/eprubetă) se însămânţează cu bacteria de studiat. După 2-3 zile de incubare la 28°C sau 37°C, în fiecare eprubetă se adaugă câte 3 ml H_2O_2 3%. În cazul unei reacţii pozitive se produce o efervescenţă datorită degajării oxigenului.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{catalaza} 2\ H_2O + O_2$$

Reacţia devine şi mai evidentă dacă înaintea adăugării de apă oxigenată în eprubetă, introducem 5 ml dintr-o soluţie de săpun 10%.

8.2.6. Proprietăţile lipolitice ale bacteriilor

Activitatea lipolitică la bacterii se poate evidenţia prin mai multe metode.

8.2.6.1. Evidenţierea activităţii lipolitice pe mediul cu tributirină

Material necesar:

- mediu cu tributirină;
- tulpini de studiat.

Tehnica de lucru:

Mediul cu tributirină are următoarea compoziţie:

peptonă	5 g
extract de drojdii	3 g
tributirină	10 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 ml

Se dizolvă ingredientele la cald. Se ajustează pH-ul la 7,5. Se sterilizează mediul la 115°C, 15 minute. Se repartizează în plăci Petri, iar după solidificare se însămânţează cu bacteriile de studiat. După

incubare (5 zile) la 28°C sau 37°C, se urmăreşte clarificarea mediului în jurul coloniilor. O zonă clară apărută în jurul coloniei demonstrează prezenţa activităţii lipolitice.

8.2.6.2. Evidenţierea activităţii lipolitice în plăci cu geloză cu ulei steril

Material necesar:

- mediu nutritiv;
- ulei de floarea soarelui steril;
- $CuSO_4$, soluţie saturată;
- bacterii de studiat.

Tehnica de lucru:

Se toarnă geloza simplă în plăci Petri ste[illegible] şi se emulsionează o anumită cantitate de ulei de floarea soarelui steril (5 ml). Se însămânţează în striuri bacteriile de studiat. După o incubare de câteva zile (3-5) placa Petri se acoperă cu o soluţie saturată de $CuSO_4$. După 30 minute se îndepărtează excesul de sulfat de cupru, iar cu o lupă se examinează picăturile de ulei. Dacă o bacterie produce lipază, picăturile de ulei de sub striuri se colorează intens în albastru deschis.

8.2.7. Testul cultivării bacteriilor în lapte turnesolat

Material necesar:

- lapte turnesolat;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

♦ bacterii de testat (culturi de 24 ore în bulion nutritiv).

Tehnica de lucru:

Laptele turnesolat are următoarea compoziţie:

lapte degresat	100 ml
turnesol	0,75 g
apă distilată	1000 ml

Se mojarează turnesolul, se amestecă cu laptele degresat şi apoi cu apa distilată. Se repartizează câte 10 ml în eprubete şi se sterilizează prin tindalizare la 100°C timp de 30 minute sau autoclavare la 115°C timp de 20 minute. Nu se sterilizează la 121°C pentru că la această temperatură cazeina se peptonizează iar lactoza se caramelizează şi mediul capătă o culoare galbenă.

Tuburile cu mediu se însămânţează cu 0,1 ml din cultura de bacterii în bulion. Se amestecă inoculul cu mediul prin rularea eprubetelor între palme pentru răspândirea uniformă în mediu a acestuia. Se incubează 2-5 zile la temperatura de 37°C.

Se pot deosebi diferite aspecte în ce priveşte comportarea bacteriilor în acest mediu:

♦ dezvoltarea fără modificarea mediului;

♦ dezvoltarea însoţită de coagularea laptelui fără acidifiere;

♦ dezvoltarea însoţită de coagulare şi acidifiere;

♦ dezvoltarea însoţită de alcalinizare datorită producerii de amine şi amoniac.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8.2.8. Alte teste biochimice

8.2.8.1. Dezvoltarea pe mediu cu manitol

Material necesar:

- mediu cu manitol;
- bacterii de testat.

Tehnica de lucru:

Compoziţia mediului cu manitol este:

peptonă	20 g
agar	4,5 g
manitol	2 g
KNO_3	1,5 g
roşu fenol 1%	4 ml
apă	1000 ml

pH = 7,2-7,3

Se repartizează mediul câte 2 ml în tuburi de hemoliză şi se sterilizează la 115°C timp de 20 minute. Se însămânţează cu bacteriile de testat şi se incubează la 28°C sau 37°C timp de 24-48 ore. Se urmăreşte modificarea culorii mediului. Dacă a avut loc fermentarea manitolului, cuioarea mediului va vira în galben.

8.2.8.2. Dezvoltarea pe agar hiperclorurat

La geloza nutritivă se adaugă clorură de sodiu astfel ca să se obţină o concentraţie finală de 6,5%. Mediile hiperclorurate au o

acțiune selectivă pentru stafilococi, streptococii din grupa enterococilor precum și pentru alte bacterii halofile.

8.2.8.3. Folosirea de către bacterii a sărurilor de amoniu ca unică sursă de azot

Material necesar:

- mediu cu săruri de amoniu;
- bacterii de testat.

Tehnica de lucru:

Compoziția mediului cu săruri de amoniu este:

NaCl	5 g
$MgSO_4$	0,2 g
$NH_4H_2Po_4$	1 g
K_2HPO_4	1 g
manitol	10 g
apă distilată	1000 ml

Se corectează pH-ul mediului la 7,2-7,4. Se sterilizează la 115°C, 20 minute. Se însămânțează bacteriile de testat și se incubează la 28 sau 37°C, după care se controlează pH-ul mediului care ne indică dacă tulpina formează acid pe acest mediu sau nu.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. *IDENTIFICAREA ŞI CLASIFICAREA UNEI BACTERII NECUNOSCUTE*

A. CARACTERE MORFOLOGICE

1. Forma celulei
2. Dimensiunile celulei
3. Mobilitatea
4. Coloraţia Gram
5. Endospori
6. Capsula
7. Dispoziţia celulelor în frotiu
8. Peretele celular
9. Materiale de rezervă

B. CARACTERE DE CULTURĂ

1. Dezvoltarea în mediu lichid
2. Dezvoltarea pe mediu solid
3. Comportamentul faţă de oxigen
   a. Dezvoltarea în condiţii de anaerobioză
   b. Dezvoltarea după necesităţile în oxigen

C. CARACTERE FIZIOLOGICE ŞI BIOCHIMICE

1. Hidroliza proteinelor
2. Hidroliza gelatinei
3. Hidroliza amidonului
4. Hidroliza lipidelor

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

5. Fermentarea glucidelor (acid, gaz, alcalinizare)
   - glucoza
   - xiloza
   - maltoza
   - sucroza
   - lactoza
6. Enzime
   - catalaza
   - ureaza
   - citrat-reductaza
7. Alte caractere fiziologice
   - lapte turnesolat
   - amonificarea
   - NH_4^+ ca unică sursă de azot
   - producerea de H_2S
   - NaCl tolerante
   - dezvoltarea pe agar cu manitol
   - hemoliza
   - sensibilitatea la antibiotice

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. ALTE GRUPE DE BACTERII

10.1. ACTINOMICETELE

Actinomicetele reprezintă un grup de microorganisme miceliene. Caracteristica morfologică a acestora este miceliul lor format din hife lungi, subțiri, drepte sau încurbate, ramificate, cu diametrul de 0,3 - 1,3 μm, în general neseptat. Miceliul actinomicetelor formează o singură celulă. În sol sau cultivate în medii lichide, miceliul unor specii se fragmentează dând naștere la celule cu aspect bacilar sau cocoid.

Pe medii de cultură solide, miceliul actinomicetelor formează colonii dense, cartilaginoase sau pieloase, foarte aderente de substrat. La cele mai multe specii pe acest miceliu de substrat se formează un miceliu aerian, pe hifele căruia se găsesc sporoforii cu spori.

Sporoforii prin formă și structură sunt caracteristici diferitelor specii și au valoare taxonomică. La unele specii sunt spiralați, cu spire lungi sau scurte, laxe sau comprimate, închise sau deschise, la altele sunt lungi, ușor încurbați sau drepți (Fig. 31). Sporii la actinomicete sunt sferici sau ovali, alungiți sau cilindrici, cu extremitățile retezate. Pe suprafața lor sporii prezintă diferite ornamentații (țepi, butoni, negi, peri) sau sunt netezi.

Marea majoritate a speciilor produc pigmenți. Speciile pigmentate au miceliul aerian colorat în: galben, portocaliu, roșu, violet, albastru, verde, cenușiu. Uneori, numai coloniile sunt colorate (specii cromofore), alteori pigmentul difuzează în substrat (specii cromopare). În unele cazuri miceliul aerian are o culoare, iar miceliul

de substrat altă culoare. Pigmentogeneza este mult influențată de compoziția mediului de cultură și condițiile de dezvoltare.

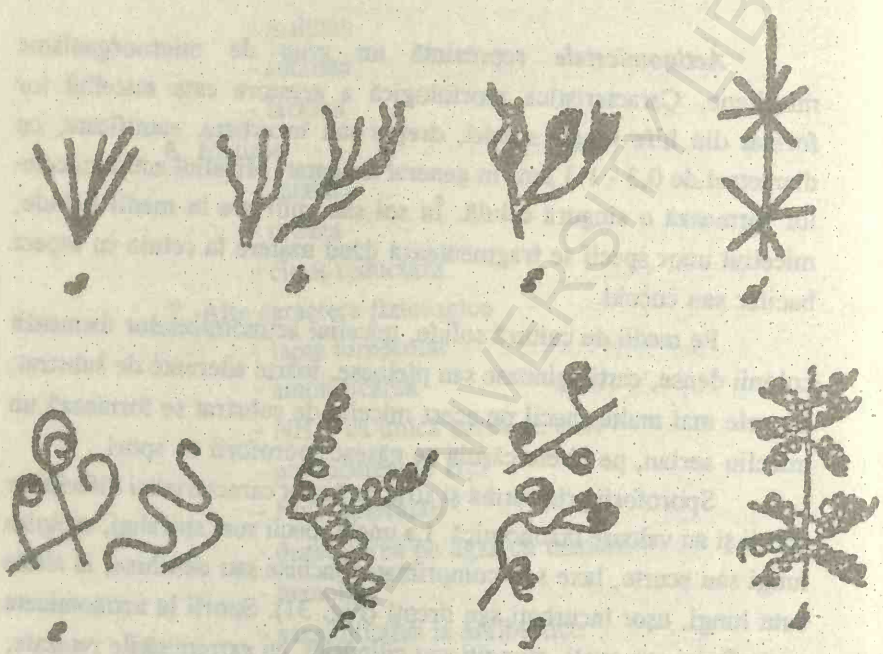


Fig. 31. Tipuri de sporofori: a) drepți; b) flexuoși; c) fasciculați; d) monoverticilat nespiralat; e) buclă închisă și deschisă; f) spirală deschisă; g) spirală închisă; h) monoverticilat spiralat.

Actinomicetele, în general, sunt imobile, cu excepția actinoplanaceelor și a altor câteva specii.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol. 4, ed. 9ª, 1989, actinomicetele formează 8 secţiuni cu 40 genuri.

Dintre acestea, din punct de vedere biotehnologic, importantă este Secţ. 29 - *Streptomyces*, pentru industria de antibiotice.

În marea lor majoritate actinomicetele sunt saprofite; populaţiile cele mai dense se întâlnesc în sol, ele reprezentând după unii autori 25% din microflora acestuia.

Izolarea actinomicetelor din sol

Actinomicetele se izolează din sol pe mediul Martin cu roz Bengal cu următoarea compoziţie:

peptonă	5 g
glucoză	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
roz Bengal	0,33 g
agar	18 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 7,0

Se sterilizează 20 minute la 115°C.

În cutiile Petri se adaugă câte 1 ml dintr-o soluţie de sulfat de streptomicină 0,07% peste care se toarnă mediul topit şi răcit la 45°C. După agitarea circulară a plăcilor în ambele sensuri, se lasă să se răcească, după care se însămânţează cu diluţii de sol. Apoi plăcile se incubează timp de 7-14 zile la termostat la 28°C. Repicarea coloniilor dezvoltate se face pe mediu mineral Gauze cu următoarea compoziţie:

KNO_3	1	g
K_2HPO_4	0,5	g
$MgSO_4$	0,5	g
$FeSO_4$	0,01	g
amidon	20	g
agar	18	g
apă distilată	1.000	ml

pH = 7,0

Se sterilizează la 121°C timp de 30 minute.

După sterilizare mediul se repartizează în eprubete sau plăci Petri, pe care apoi se repică coloniile de actinomicete pentru a se observa: miceliul aerian, miceliul de substrat, pigmentaţia, forma sporoforilor etc.

Cultivate submers, speciile genului *Streptomyces* dezvoltă un miceliu format din hife lungi şi subţiri, neseptate, miceliul formând o singură celulă.

Pentru observarea miceliului se execută frotiuri:

- pe o lamă de sticlă ţinută înclinat, cu ajutorul unei pipete Pasteur se prelevează miceliul dezvoltat submers;
- se lasă să se usuce la temperatura camerei;
- se fixează cu soluţia Carnoy (timp de 10-15 minute):

acid acetic	100 ml
cloroform	300 ml
alcool etilic	600 ml

- se colorează cu soluţie de albastru de metilen 1%,

timp de 5 minute;

- se spală frotiul cu apă şi se usucă;
- se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

La examenul microscopic se observă miceliul colorat în albastru.

Selectarea actinomicetelor producătoare de antibiotice

Microorganismele producătoare de antibiotice aparţin în general bacteriilor miceliene (actinomicete), specii ale genului ***Streptomyces***. Selectarea microorganismelor producătoare de antibiotice se face prin două metode:

1. Testarea unui singur microorganism presupus producător de antibiotice, faţă de mai multe microorganisme test;
2. Testarea mai multor microorganisme presupuse producătoare de antibiotice, faţă de un singur microorganism test.

În cele ce urmează prezentăm ambele metode:

1. **Selectarea prin testare a unui singur microorganism presupus producător de antibiotice, faţă de mai multe microorganisme test.**

Materiale necesare: culturi ale actinomicetelor care se testează, în vârstă de 7 zile, pe mediul Gauze solid; culturi în bulion, în vârstă de 24-48 ore ale microorganismelor test. În calitate

de microorganisme test se folosesc: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Sarcina lutea* etc.;

Tehnica de lucru:

- din culturile actinomicetelor care se testează se fac însămânţări, pe mediul pentru testarea proprietăţilor antagoniste, aflat în plăci Petri. Însămânţarea se face sub forma unui striu, la marginea plăcii (Fig. 32);

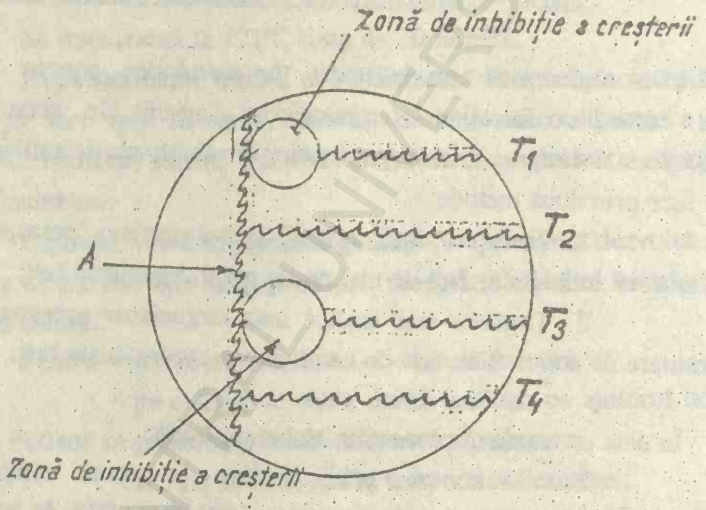


Fig. 32. Selectarea microorganismelor producătoare de antibiotice (I):

A - microorganisme presupuse producătoare; $T_1T_2T_3T_4$ - microorganisme test.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- placa se notează şi se incubează la 28° C, timp de 72-96 ore, pentru dezvoltare; actinomicetele se dezvoltă numai pe striul de însămânţare; din culturile microorganismelor, în vârstă de 24-48 ore, se fac apoi însămânţări sub formă de striuri perpendiculare pe striul de creştere al culturii de actinomicete testate;

- placa se notează din nou şi se incubează în continuare la 28-30°C, eventual 37°C, timp de 24-48 ore, după care se citesc rezultatele.

Interpretarea rezultatelor: dacă una din culturile de actinomicete testate produce un antibiotic activ contra unuia dintre microorganismele test, acesta difuzează în mediu şi ca urmare, se observă o zonă de inhibiţie a creşterii microorganismului test, în apropierea striului de creştere a culturii de actinomicete respective. Zona de inhibiţie este cu atât mai mare cu cât antibioticul este mai activ. Sensibilitatea microorganismului test faţă de antibioticul respectiv, se apreciază astfel:

- 20-30 mm = foarte sensibil;
- 12-20 mm = sensibil;
- 8-12 mm = puţin sensibil;
- 8 mm = nesensibil.

2. Selectarea prin testarea mai multor microorganisme presupuse producătoare de antibiotice, faţă de un singur microorganism test:

a) obţinerea culturilor de actinomicete presupuse

producătoare de antibiotice;

b) selectarea propriu-zisă.

a) Obținerea culturilor de actinomicete:

Materiale necesare: culturi de actinomicete în vârstă de 7 zile pe mediul Gauze solid. Se folosesc în special actinomicete din genul *Streptomyces*.

Tehnica de lucru: se recoltează cu ansa, în mod steril, din culturile de actinomicete care se testează o cantitate oarecare și se inoculează mediu Gauze lichid. Pentru o dezvoltare mai bună se inoculează 2 anse din culturile respective la 20 ml mediu. Baloanele de notează și se incubează la 28-30°C, timp de 7 zile.

b) Selectionarea propriu-zisă:

Materiale necesare: culturile de actinomicete care se testează, în vârstă de 7 zile pe mediu Gauze lichid; culturi de microorganisme test patogene și nepatogene în vârstă de 24 ore, pe geloză nutritivă. În calitate de microorganisme test se pot folosi: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Sarcina sp., Micrococcus sp.* și orice alte culturi bacteriene existente în laborator; plăci Petri cu geloză nutritivă turnată din ajun; tuburi de hemoliză cu 2 ml apă fiziologică sterilă; anse; pipete gradate sterile de 2 ml; rondele de hârtie de filtru sterile. Aceste rondele se taie din hârtie de filtru obișnuită, cu un perforator, se pun într-o placă Petri,

BCU IAȘI - FOND CARTE VECHE

care se înfăşoară în hârtie şi se sterilizează la cuptorul Pasteur; pense sterile; tuburi de hemoliză sterile; pipete gradate sterile de 5 ml; vas cu soluţie dezinfectantă; creion de scris pe sticlă; bec de gaz.

Tehnica de lucru:

♦ Din culturile de microorganisme test se fac suspensii în 2 ml apă fiziologică sterilă;

♦ Se ia aproximativ 1,5 ml din suspensia astfel pregătită şi se însămânţează o placă Petri cu geloză nutritivă, după metoda însămânţării în pânză;

♦ Din culturile de actinomicete pe mediu lichid care se testează, se ia cu o pipetă sterilă aproximativ 5 ml mediu, care se trece într-un tub de hemoliză steril;

♦ Cu o pensă sterilă se ia o rondelă de hârtie de filtru sterilă şi se introduce în tubul de hemoliză cu lichidul de cultură ai uneia din culturile de actinomicete care se testează;

♦ După ce rondela se îmbibă în acest lichid, se depune pe suprafaţa mediului din placa Petri, mediu care a fost însămânţat cu microorganismul test, aşa cum s-a arătat mai înainte;

♦ Cu altă pensă sterilă se ia altă rondelă de hârtie de filtru şi se îmbibă în lichidul de cultură al altei culturi de actinomicete care se testează, lucrând în mod similar. În acest mod, pe o placă Petri se pot testa 4-6 culturi de actinomicete (Fig. 33).

♦ Plăcile astfel pregătite se notează şi se incubează la 30°C, timp de 24-48 ore.

BCU IASI

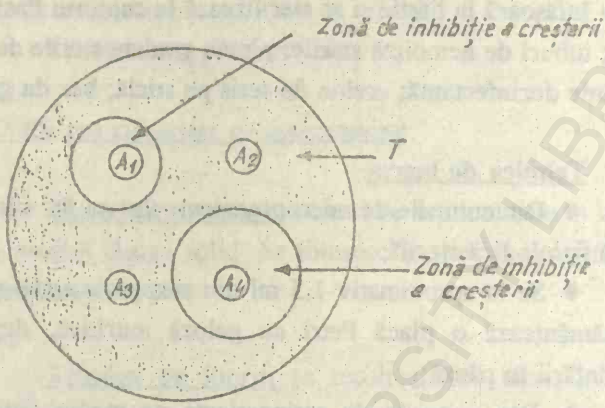


Fig. 33. Selectarea microorganismelor producătoare de antibiotice (II): T = microorganism test; A_1, A_2, A_3, A_4 = microorganisme producătoare de antibiotice.

Interpretarea rezultatelor:

Dacă vreuna din culturile de actinomicete testate produce un antibiotic activ contra microorganismelor test, acesta difuzează în mediu şi în jurul rondelei de hârtie de filtru respective apare o zonă de inhibiţie a creşterii (Fig. 33). Măsurând diametrul zonei de inhibiţie, sensibilitatea microorganismului test faţă de antibioticul respectiv, se apreciază aşa cum s-a arătat anterior.

10.2. CYANOBACTERIILE (algele albastre-verzi)

Cyanobacteriile sunt microorganisme procariote, unicelulare, cu celule izolate sau reunite în colonii simple, de formă filamentoasă (*Oscillatoria, Plectonema*) sau de forma unor salbe de mărgele

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(*Nostoc*) cuprinse într-o masă mucilaginoasă. Uneori coloniile prezintă o formă lameiară sau chiar globuloasă (Fig. 34).

Fig. 34. Cyanobacterii: a) *Oscillatoria*; b) *Nostoc*; c) *Anabaena*; d) *Microcystis*; e) *Gloeocapsa*; f) *Merismopedia*.

Morfologic, cyanobacteriile pot fi mai mult sau mai puțin sferice, ovale, turtite sau alungite.

Adesea cyanobacteriile trăiesc în colonii. Aceste colonii sunt foarte caracteristice. Membrii unei colonii pot fi din punct de vedere morfologic și fiziologic asemănători sau diferiți. În numeroase cazuri în una și aceeași colonie filamentoasă sau de forma unor șiraguri de mărgele, alături de numeroase celule comune se pot distinge și așa numitele heterociste, de obicei mai mari, cu citoplasma uniformă, clară, nediferențiată. Acestea pot fi celule de rezistență sau punctul de minimă rezistență de unde se rup filamentele și astfel prin

fragmentare ele contribuie la înmulţirea pe cale vegetativă şi la răspândirea lor. Astfel în una şi aceeaşi colonie se remarcă diferenţieri în celule mari, bazale şi în celule apicale, din ce în ce mai mici şi mai alungite.

Coloniile filamentoase se ramifică uneori, dar numai în aparenţă. În realitate, este vorba despre o pseudoramificare. Alteori, coloniile prezintă forme globuloase.

Izolarea şi cultivarea cyanobacteriilor

Material pentru izolare: se foloseşte mâl, apă de lac, iazuri sau apă de mare.

Mediul mineral pentru izolarea şi cultivarea cyanobacteriilor (agar după KNOP):

$Ca(NO_3)_2$	1 g
$MgSO_4$	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
KNO_3	0,25 g
soluţie concentrată de $FeSO_4$	2 picături
agar	15 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 5,6 - 5,8

Sterilizarea 20 minute la 121°C.

Tehnica de lucru:

Mediul se repartizează în plăci Petri care după solidificare se însămânţează cu suspensii-diluţii de mâl sau apă. Se incubează la lumină albă la 25°C, timp de câteva săptămâni sau până se constată o bună dezvoltare.

Pentru cultivarea culturilor pure de cyanobacterii se foloseşte mediul Agar după Knop la care se adaugă manitol 0,5%.

Examinare:

Cu ajutorul unui ac spatulat se ia din cultura de alge de pe suprafaţa mediului şi se depune pe o lamă de sticlă bine curăţată şi degresată, într-o picătură de apă distilată. Se acoperă cu o lamelă şi se observă la microscop cu un obiectiv uscat (20 x sau 40 x).

11. LEVURILE

Levurile sau drojdiile sunt fungi microscopici, unicelulari a căror aparat vegetativ esre reprezentat de un dermatoplast.

Forma celulelor este variată: sferică la *Saccharomyces cerevisiae*, elipsoidală la *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, triunghiulară la *Trigonopsis sp.*, cu dimensiunile celulei cuprinse între 5,6 x 7,2 μm. Forma celulelor de levuri poate varia în funcţie de condiţiile mediului, starea fiziologică, vârsta celulelor. Se cunosc levuri monomorfe, dimorfe, polimorfe, după cum sunt reprezentate de una, două sau mai multe forme celulare.

Se înmulţesc asexuat prin înmugurire sau burjonare şi un

număr mic de specii prin sciziparitate, analog cu bacteriile.

Sexuat se înmulţesc prin ascospori care se formează în asce, în general formându-se câte 4 ascospori si prin bazidiospori care se formează în bazidii.

Levurile sunt larg răspândite în natură. Sunt adaptate la medii cu un conţinut ridicat de zahăr, nectarul florilor sau suprafaţa fructelor. Solul constituie doar un mediu natural de conservare (numai sub formă de spori).

După clasificarea lui KREGER VAN RIJ (1984) levurile sunt grupate în 3 clase:

♦ În clasa *Ascomycotina* sunt incluse levurile care se reproduc în special asexuat, prin înmugurire, dar au şi proprietatea genetică de a forma ascospori prin meioză. Clasa cuprinde două familii: *Spermophtoraceae* cu 3 genuri şi *Saccharomycetaceae* cu 4 subfamilii şi 23 genuri.

Familia *Saccharomycetaceae* cuprinde numeroase drojdii cu implicaţii deosebite în procesele fermentative şi de alterare în industria alimentară ca: *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus, Saccharomyces uvarum, Saccharomyces pasteurianus*.

♦ Clasa *Basidiomycotina* cuprinde 4 familii ce includ levuri care se reproduc sexuat prin formare de bazidiospori. Aceste drojdii sunt puţin implicate în industria biotehnologică.

♦ În clasa *Deuteromycotina* sunt incluse levurile imperfecte (false) care se reproduc numai asexuat, clasificate în două familii:

Familia *Sporobolomytcetaceae* cu două genuri, fără implicaţii

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

în biotehnologii;

Familia *Cryptoccoceaceae* cu 15 genuri din care două genuri sunt cu implicații în biotehnologii: *Candida* și *Rhodotorula*.

Genul *Candida: Candida utilis, Candida tropicalis* și *Candida robusta*, folosite pentru obținerea de biomasă levuriană;

Genul *Rhodotorula: Rodothorula rubra* folosită pentru proprietatea de a produce provitamina A (β-carotenul) pentru îmbunătățirea conținutului în vitamine a biomasei levuriene.

Medii de cultură folosite pentru dezvoltarea levurilor

Mediul cu extract de malț (lichid)

extract de malț	20 g
apă distilată	1.000 g

pH = 5,6

Sterilizare 15 minute la 121°C.

Mediul cu extract de malț (solid)

extract de malț	20 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 g

pH = 5,6

Sterilizare 15 minute la 121°C.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mediul Sabouraud

peptonă	10 g
glucoză	20 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 g

pH = 6 - 6,3

Sterilizare 20 minute la 121°C.

Mediul glucoză-extract de drojdie

extract de drojdie	5 g
glucoză	20 g
agar	20 g
apă distilată	1.000 g

Sterilizare 20 minute la 115°C.

pH-ul se corectează la valoarea 4 cu acid tartric sau citric, în momentul utilizării, la 50°C.

Must de bere sau must de struguri-geloză

Aceste medii sunt utilizate în principal în industriile berii şi vinului. Sunt musturi deproteinizate prin încălzire la 120°C apoi filtrate şi solidificate cu agar.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mediul PDA (Potatoes-Dextrose-Agar)

extract de cartof	4 g
glucoză	20 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 g

Sterilizare 15 minute la 121°C.

După răcirea mediului la 50°C se acidifiază la pH = 3,5 cu acid clorhidric diluat, acid fosforic sau acid tartric 10%. Incubarea 3-5 zile, la 20-25°C; acest mediu este cel mai utilizat pentru numărarea drojdiilor din produsele alimentare.

Medii de cultură folosite pentru formarea ascosporilor

Drojdiile incluse în clasa ***Ascomycotina*** pot să formeze în anumite condiţii de cultivare, ascospori. Evidenţierea capacităţii de formare a ascosporilor se poate realiza prin metode culturale.

Cel mai frecvent sunt utilizate mediile:

Mediul cu morcov-agar

450 g morcovi raşi se pun împreună cu 3.600 ml apă şi se lasă la macerat timp de o oră.

Se fierbe apoi 10 minute şi se trece prin tifon. Lichidul obţinut se aduce la pH = 5 şi se solidifică prin adăugare de 20 g agar/l.

Se repartizează în eprubete şi se sterilizează la autoclav 15 minute la 121°C.

După 30 zile de la însămânţarea drojdiei şi o incubare la 25°C se fac din culturile dezvoltate preparate între lamă şi lamelă şi se

colorează cu violet de genţiană pentru observarea ascelor cu ascospori.

Mediul Fowels

acetat de sodiu	0,4 g
agar	1,5 g
apă distilată	100 ml

Mediul Gorodkova

glucoză	0,1 g
peptonă	1,0 g
NaCl	0,5 g
agar	2,5 g
apă distilată	100 ml

Mediile sunt sterilizate 15 minute la 115°C.

În eprubete cu mediu înclinat se însămânţează levura dintr-o cultură de 48 ore în mediu lichid (must de malţ) şi după incubare timp de 3-5 zile la 25°C, se apreciază prin examen microscopic prezenţa şi numărul ascosporilor/celulă, forma lor şi poziţia în ască.

Deoarece nu toate levurile au aceleaşi exigenţe se recomandă utilizarea simultană a mai multor medii care să confirme capacitatea lor de a forma ascospori.

Saccharomyces cerevisiae

Caractere morfologice

De obicei celulele au formă sferică sau ovală (5 - 12) x (5-10) μm dar uneori pot fi elipsoidale sau chiar cilindrice (5-20) x (3-9) μm.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se reproduce prin înmugurire multipolară. Celulele pot fi izolate sau asociate în perechi sau lanţuri. Uneori, după incubare prelungită se formează ascospori, o ască conţine 1-4 ascospori, sferici sau ovali cu suprafaţa netedă (Fig. 35).

Caractere culturale

În mediu lichid produce tulbureală, iar la suprafaţă formează o spumă fină, cu aspect mat. La sfârşitul fermentaţiei formează un sediment compact.

Pe mediu solid, după 3 zile de incubare la 25°C, formează colonii cu diametrul de 1-2 mm, albesau de culoare crem, convexe, cu perimetrul circular şi suprafaţa lucioasă.

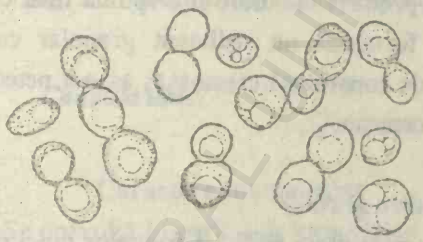


Fig. 35. *Saccharomyces cerevisiae*

Importanţă

Este utilizată în fabricarea spirtului, la obţinerea drojdiei comprimate şi la fabricarea unor sortimente de bere; de asemenea, este folosită la obţinerea unor compuşi intracelulari valoroşi pentru biotehnologii şi inginerie genetică şi la obţinerea de plasmolizate,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

autolizate şi extracte de drojdie. Cu ajutorul ei se obţin industrial prin biosinteză vitamine din grupul B şi invertază (β-fructofuranozidază).

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoideus*

Caractere morfologice

Celulele au formă elipsoidală, globuloasă sau elipsoidal alungită, cu dimensiuni de (3,0 - 6,0) x (6,0 - 12,5) μm, dispuse singular, în perechi sau lanţuri.

Înmugurirea se realizează de obicei polar, iar mugurele poate rămâne alipit de celula mamă. Poate forma 1-4 ascospori de formă sferică sau ovală (Fig. 36).

Caractere culturale

Pe must de malţ produce tulburare şi o spumă fină, cu aspect mat, după 24-72 ore, formează un sediment granular cu contur circular sau slab lobat, de consistenţă cremoasă, aspect neted, lucios de culoare albă sau alb-cenuşiu.

Răspândire şi rol

Este prezentă în microflora epifită a fructelor dulci (struguri, pere, mere, prune). În mustul de struguri, în fermentaţie poate reprezenta 80% din microflora levuriană prezentă.

Se utilizează la prepararea maielei în tehnologia vinificaţiei. Din sedimentul drojdiei rezultat în urma proceselor de vinificaţie se pot obţine extracte proteice de uz furajer sau pentru prepararea mediilor de cultură.

BCU IASI

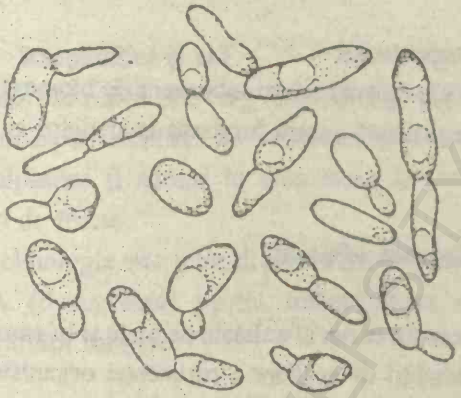


Fig. 36. *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*

Candida utilis

Caractere morfologice

Se dezvoltă în parte sub forma unor celule sferice sau ovale, de 2-4 μm asemănătoare levurilor şi în parte sub forma unui pseudomiceliu format din celule filamentoase, neramificate. Acestea se divid prin ştrangulare şi dau naştere la celule de tipul levurilor. Se reproduc prin înmugurire.

Caractere culturale

Pe mediu lichid se dezvoltă formând un voal subţire, cutat, de culoare cenuşie sau gălbuie. Pe mediu solid formează colonii rugoase,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu margini neregulate, crenelate, de culoare albă.

Importanţă

Este o specie folosită pentru obţinerea de biomasă cu conţinut ridicat în proteine utilizată pentru furajarea animalelor şi a păsărilor.

Candida albicans

Este comensală la om şi animale pe piele şi în cavitatea bucală sau intestin. În condiţii de scădere a rezistenţei organismului sau în cazul unor tratamente prelungite cu antibiotice cu spectru larg, *Candida albicans* produce infecţii cunoscute sub numele de candidoze.

Rhodotorula rubra

Caractere morfologice

Este o levură ce prezintă celulele sferice sau ovoidale. Se reproduce prin înmugurire multipolară. Se întâlneşte sub formă de celule izolate sau în perechi. Unele tulpini pot forma celule alungite.

Caractere culturale

Pe medii de cultură solide formează colonii de culoare roşie, cu consistenţă mucoasă. Sunt levuri psihrofile şi pot creşte într-un domeniu de temperatură cuprins între 25-35°C. Au o termorezistenţă mai ridicată decât a celorlalte drojdii şi pot supravieţui după o

încălzire la 62,5°C, timp de 10 minute.

Răspândire şi rol

Rhodotorula rubra este larg răspândită pe suprafaţa fructelor şi legumelor proaspăt recoltate. Se întâlneşte în microflora epifită a frunzelor şi tulpinilor şi adesea în microflora boabelor de cereale, măsline, sucuri de fructe.

În biotehnologie este folosită pentru proprietatea de a produce provitamina A (β-carotenul) pentru îmbunătăţirea conţinutului în vitamine a drojdiilor furajere.

11.1. METODE ŞI TEHNICI DE STUDIU A LEVURILOR

A. Tehnici de numărare

Stabilirea numărului de celule de levuri dintr-un produs sau cultură se realizează prin diferite tehnici (C.M. BURGEOIS):

- numărare directă a celulelor de levuri;
- numărare indirectă (metoda de cultivare KOCH);
- numărare prin filtrare pe membrane în cazul produselor lichide sau solide, slab contaminate;
- numărare aproximativă prin cultivare în medii lichide (metoda nefelometrice).

Metoda directă de numărare a levurilor

Camerele de numărat reprezintă lame de sticlă prevăzute cu trei platforme, dintre care platforma centrală este denivelată faţă de

celelalte două cu 0,10 mm. Platformele sunt separate între ele prin rigole de sticlă. Pe platforma centrală este gravată o rețea din linii perpendiculare care delimitează o anumită suprafață divizată de către linii, în microcelule de formă pătrată. Se cunosc mai multe tipuri de celule de numărare cum ar fi: camera Thoma, Turk, Bürker, Goreaev, construite pe același principiu, diferența între ele constând în suprafața unei microcelule, suprafață notată pe fiecare cameră.

Camera Thoma, frecvent folosită la numărare, prezintă, gravate pe ambele părți ale platformei centrale, câte o rețea cu suprafața de 1 mm^2 divizată în 400 microcelule elementare: deci suprafața unei microcelule este 1/400 mm^2. Se execută un preparat umed, plasând suspensia de celule pe suprafața rețelei, se așază lamela care, sprijinindu-se pe cele două platforme laterale, va delimita înălțimea stratului de lichid, egală cu adâncimea camerei (0,1 mm). Preparatul astfel obținut se fixează de platină cu cleme și cu ocular de 10 și obiectiv 45 x se caută imaginea rețelei. În câmpul microscopic, la grosisment 450, cu ajutorul platinei se pot aduce grupe de câte 16 microcelule elementare și se face numărarea celulelor de levuri cuprinse în grupul de 4 x 4 microcelule. Se exclud de la numărare celulele levuriene care se află cu mai mult de jumătate din suprafața celulei în exteriorul careului de 4 x 4. Se fac numărări din mai multe câmpuri microscopice (minimum 10) și se calculează numărul mediu de celule dintr-o microcelulă. Cunoscând suprafața unei microcelule precum și volumul său ($V = 1/400 \cdot 1/10$ mm^3) în funcție de diluția folosită, numărul de celule prezente într-un ml lichid de analizat, se calculează cu formula:

$$N = n \times 4000 \times 1000 \times K$$

n = numărul mediu de celule/microcelulă;
4.000 = volum microcelulă;
1.000 = factor de transformare în cm^3;
K = coeficient de diluţie.

Numărarea indirectă a levurilor

Metoda indirectă culturală constă în însămânţarea unui volum cunoscut din suspensia de celule pe medii de cultură solidificate în plăci Petri şi după o perioadă de cultivare se face numărarea coloniilor, considerând că fiecare colonie este rezultată prin multiplicarea unei singure celule.

Metoda cultivării în plăci este des folosită pentru determinarea numărului de microorganisme vii dintr-un produs alimentar şi permit în acelaşi timp o analiză calitativă prin studiul caracterelor morfologice ale coloniilor dezvoltate.

După prepararea diluţiilor prin tehnica cunoscută folosind pipete sterile pentru fiecare diluţie, se recoltează câte 1 ml din suspensia omogenizată a ultimelor trei diluţii şi prin deschiderea capacului plăcii Petri sterile se lasă să treacă numai pipeta şi se lasă să se scurgă conţinutul. Peste volumul de suspensie se toarnă mediul de cultură steril, lichefiat în prealabil pe baie de apă, răcit la o temperatură de 42-45°C şi imediat, prin rotire în plan orizontal a plăcii se face omogenizarea cu mediul şi se lasă în repaus pentru solidificarea mediului. Se recomandă ca din aceeaşi diluţie să se facă însămânţări în câte 3 plăci.

BCU IASI - UNIVERSITY LIBRARY

Plăcile cu mediile însămânţate se introduc în termostat pentru dezvoltare. Numărarea coloniilor dezvoltate se face după un anumit timp care depinde de viteza de creştere precum şi de temperatură.

Pentru numărare se aleg plăcile în care numărul de colonii este cuprins între 50-150 (după alţi autori între 30-300). Plăcile cu un număr mai mic de 10 nu se iau în consideraţie.

Pentru determinarea numărului probabil de levuri se înmulţeşte numărul coloniilor dintr-o placă Petri cu valoarea inversă a diluţiei respective. De exemplu, dacă în placa însămânţată cu 1 ml din diluţia 10^{-3} s-au găsit 20 colonii, atunci numărul total de celule va fi $20x10^{-3}$.

Numărarea levurilor prin filtrare prin membrane

După filtrare prin membrană, aceasta se aşază pe suprafaţa unui mediu cu geloză sau tampon de hârtie impregnat cu un mediu lichid pentru levuri. După incubare la o temperatură şi un timp corespunzător se numără coloniile formate la suprafaţă membranei. Membrana filtrantă pentru reţinerea celulelor de levuri trebuie să prezinte pori cu dimensiuni mai mici de 0,8 μm.

Determinarea concentraţiei celulelor de levuri prin metoda nefelometrică

Metoda nefelometrică se bazează pe măsurarea intensităţii unui flux luminos difuzat de către celulele ce se găsesc în suspensie prin metoda egalării, cu ajutorul dispozitivului nefelometric.

În practica de laborator se prepară etaloane nefelometrice din sulfat de bariu stabile un an de zile. Într-o serie de zece eprubete egale

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se repatizează o soluţie de clorură de bariu 1% în cantităţi progresiv crescânde, începând cu cantităţi de 0,1 ml până la 1 ml. Se completează cu o soluţie de acid sulfuric 1%, până la un volum de 10 ml în fiecare eprubetă.

Opacitatea formată de sulfatul de bariu rezultat din reacţie corespunde în prima eprubetă unei concentraţii microbiene de 3×10^3 celule/ml; etalonul următor corespunde la o concentraţie de 6×10^3, al treilea etalon la 9×10^3 celule/ml. Eprubetele ce conţin etaloanele preparate se obturează cu dopuri de cauciuc pentru a preveni concentrarea, iar în momentul folosirii se omogenizează conţinutul.

11.2. TEHNICI DE APRECIERE A ACTIVITĂŢII METABOLICE A LEVURILOR

În funcţie de condiţiile de cultivare şi vârstă, ievurile pot prezenta activitate metabolică diferenţiată, concretizată prin trei stări în care se pot afla celulele şi anume:

- *starea de metabioză (activă)* în care celulele au activitate metabolică maximă. În condiţii favorabile de cultură, celulele cresc, se reproduc şi acumulează intracelular substanţe de rezervă (glicogen şi trehaloză);
- *starea de anabioză (latentă)*, celulele îşi menţin caracteristicile, dar nu se pot înmulţi. Această stare apare când substanţele nutritive ale mediului sunt epuizate, iar celulele consumă din substanţele de rezervă intracelulare;
- *starea de autoliză (moartea fiziologică a celulei)*. Se produce o solubilizare a compuşilor intracelulari sub acţiunea

propriilor enzime. Pentru aprecierea activităţii metabolice a celulelor de levuri se efectuează următoarele analize:

Aprecierea gradului de înmugurire. Se execută un preparat umed din suspensia de celule de studiat. Din 5-10 câmpuri diferite se determină numărul total de celule şi separat, celulele înmugurite. Se face o medie şi se calculează procentul de celule înmugurite. În funcţie de stadiul de cultivare, procentul de celule înmugurite poate varia de la 30-90%.

Evidenţierea incluziunilor de glicogen. Se realizează prin executarea de preparate umede în care celulele de levuri sunt suspensionate în soluţie Lugol. Lugolul pătrunde în celulă şi colorează incluziunile de glicogen în brun-roşcat. Prezenţa acestor incluziuni intracelulare în număr mare certifică starea activă în care se află levurile.

Evidenţierea celulelor autolizate. O suspensie de levuri se amestecă în proporţii egale cu o soluţie de albastru de metilen diluat şi după 3-5 minute se execută un preparat umed. În preparat celulele autolizate vor apărea intens colorate în albastru, comparativ cu celulele vii, necolorate.

Soluţia diluată de albastru de metilen conţine (g%): albastru de metilen (0,01 g), citrat de sodiu $2.H_2O$ (2 g).

Albastrul de metilen pătunde atât în celulele vii cât şi în cele autolizate, dar în celulele vii sunt active reductazele, enzime care reduc indicatorul redox (albastru de metilen) la un leucoderivat

incolor, încât în preparatul umed celulele vii sunt incolore. În celulele autolizate reductazele sunt inactivate şi prin urmare reacţia de reducere nu are loc; în preparatul umed celulele autolizate sunt colorate în albastru.

Se face numărarea cu camera Thoma a numărului total de celule şi separat a celulelor autolizate şi se determină procentul de celule moarte.

11.3. METODE DE DETERMINARE A PUTERII FERMENTATIVE A LEVURILOR

Puterea fermentativă a levurilor se poate determina prin mai multe metode.

Metoda bilei de aluat. Cunoscută şi ca metoda Ostrovschi, ea determină durata de ridicare a unei bile de aluat preparată în condiţii standard, ca urmare a creşterii de volum prin degajarea de CO_2 prin fermentaţie şi reţinut în masa de aluat (Tabel 3).

Tehnica de lucru: Se cântăresc 3,12 g drojdie comprimată şi se suspensionează în 50 ml apă. După omogenizare se pipetează 5 ml care se introduc într-un mojar şi se amestecă cu 7,5 g făină. Se frământă timp de 5 minute formându-se o bilă de aluat care se introduce într-un pahar Berzellius cu 200 ml apă la temperatura de 32° C şi se notează timpul. Prin cronometrare se determină durata de ridicare a bilei la suprafaţa apei şi se apreciază calitatea drojdiei astfel:

Tabelul 3

Evaluarea puterii fermentative a levurilor

Timp (minute de ridicare a bilei de aluat)	Calitatea drojdiei
10 - 15	Foarte bună
15 - 22	Bună
22 - 30	Satisfăcătoare
Peste 30	Slabă

Metoda de dospire. Determină durata de creştere a volumului de aluat în condiţii determinate.

Tehnica de lucru: Se cântăresc 5 g drojdie care se amestecă cu 160 ml soluţie de sare 2,5% la temperatura de 35°C. Se frământă un aluat cu 280 g făină de grâu păstrată la termostat la aceeaşi temperatură. Aluatul se introduce într-o formă specială şi se cronometrează durata de creştere a aluatului până la înălţimea de 70 mm.

Determinarea capacităţii fermentative a levurilor cu ajutorul fermentometrului QE - 101

Principiul metodei: Pentru determinarea capacităţii fermentative a unei levuri se măsoară cantitatea gazului format de 200 ml soluţie de glucoză 2.5% în prezenţa a 1% levură, în decusul a două ore, la 30°C (Fig. 37).

BCU IAŞI CENTRU VECHI LIBRARY

În urma rezultatelor obținute se trage concluzia asupra calității levurei.

Reactivi:

1. Soluție 2,5% glucoză Merck: se cântăresc 5 g glucoză care se introduc într-un balon cotat de 200 ml, umplându-se balonul până la semn. Soluția de glucoză se încălzește în baia de apă la temperatura de 30°C.

2. Se cântăresc 2,0 g levură de analizat și se amestecă cu soluția de glucoză 2,5% încălzită la 30°C.

3. Soluție NaCl 25% cu care se umple biureta de gaz până la semnul O. La concentrația de 25% NaCl, CO_2 rezultat în urma fermentației nu se dizolvă în apă și astfel se poate măsura.

Tehnica de lucru: Suspensia de levuri în soluție de glucoză se repartizează în vasele fermentometrului (în fiecare vas câte 200 ml soluție), se închid ermetic și se scufundă în baia termostatată a aparatului, la 30°C.

Colectarea și măsurarea gazului (CO_2) rezultat în urma fermentației se efectuează prin cele două biurete ale fermentometrului.

Măsurătorile încep exact după 5 minute de la introducerea în baia termostatată.

Citirea cantității de CO_2 rezultat în urma fermentației se efectuează timp de două ore, din 30 în 30 de minute pentru ambele biurete. În final se face media celor două citiri.

Volumul de gaz emis în două ore caracterizează capacitatea fermentativă a levurilor.

Concluziile se trag astfel:

peste 60 ml CO_2	- levură de foarte bună calitate
între 40 - 60 ml CO_2	- levură de bună calitate
între 30 - 40 ml CO_2	- levură de calitate mijlocie
între 20 - 30 ml CO_2	- levură de calitate slabă
sub 20 ml CO_2	- levură inutilizabilă

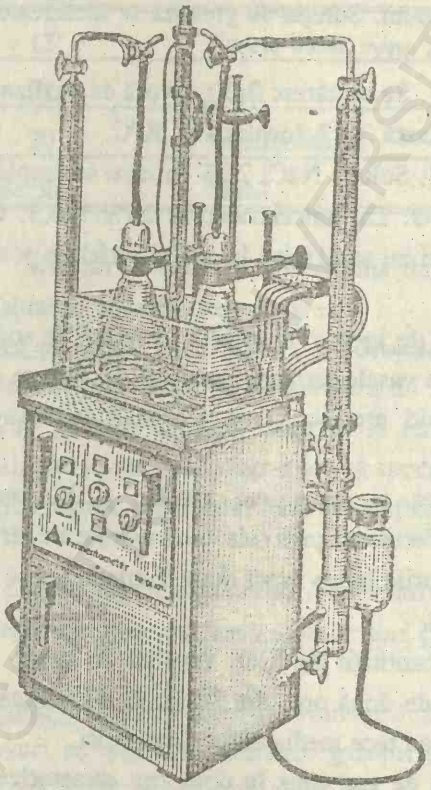


Fig. 37. Fermentatorul QE-101

BCU IASI VERSITY LIBRARY

12. MUCEGAIURILE

Mucegaiurile sunt ciuperci filamentoase, saprofite sau parazite cu o organizare biologică diferenţiată şi caracteristică determinată de adaptările lor la diferite medii de viaţă.

Structura celulară la mucegaiuri este de tip eucariot. Sunt heterotrofe şi adaptate la cele mai vitrege condiţii de mediu, nesuportate de alte microorganisme.

Mucegaiurile se întâlnesc în cele mai variate medii naturale, diferite tipuri de sol, în ape, pe substanţele organice în descompunere, în aer, pe alimente etc.

Posedând un echipament enzimatic complex, ele descompun substratul pe care se dezvoltă.

Cele mai multe mucegaiuri sunt saprofite, dar există numeroase specii parazite (mai frecvent la plante). Unele specii au o mare importanţă industrială.

Activitatea lor biochimică potenţială prezintă importanţă deosebită în industria alimentară şi chimică (maturarea brânzeturilor, producerea prin fermentaţie a acidului citric etc.), în industria de medicamente (producerea penicilinei şi a altor antibiotice).

Mucegaiurile au reprezentanţi în familiile *Mucoraceae* şi *Aspergillaceae*.

Familia *Mucoraceae*

Cuprinde ciuperci în marea lor majoritate saprofite care produc mucegaiuri pe substratele pe care se dezvoltă (diferite produse alimentare, animale şi vegetale, pe dejecţii etc.). Unele mucoraceae

parazite produc micoze la om şi animale. Unele specii au o mare activitate enzimatică, producând fermentaţii alcoolice cum este *Mucor javanicus*.

Mucoraceaele sunt bine reprezentate în microflora din sol, fiind chiar caracteristice în anumite soluri din pădurea de molid.

Genurile caracteristice ale familiei *Mucoraceae* sunt: *Rhizopus* şi *Mucor*.

Genul *Rhizopus* are ca specie tip *Rhizopus nigricans* (mucegaiul negru al pâinii).

Acest mucegai prezintă un miceliu neseptat, diferenţiat în rizoizi ramificaţi care pătrund în substrat şi hife orizontale stolonifere care se întind pe suprafaţa substratului. Din aceste hife orizontale unele se orientează perpendicular şi în sus formând sporangioforii (Fig. 38).

Sporangioforul neramificat este lung de 2-3 mm şi se lărgeşte spre vârf constituind un sporange care se individualizează prin apariţia unui perete transversal. Sporangioforul se continuă în sporange cu o porţiune de formă emisferică, numită columelă.

Sporangii sunt globuloşi, de culoare albicioasă când sunt tineri şi negri la maturitate. În ei se formează numeroşi spori sferici care se eliberează prin ruperea peretelui sporangelui.

Alte specii ale genului: *Rhizopus oryzae* şi *Rhizopus japonicus*. Aceste două specii sunt utilizate în fermentaţia alcoolică.

BCU IASI

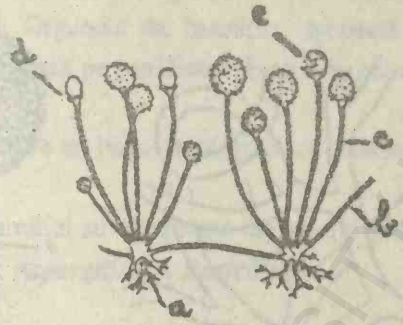


Fig. 38. *Rhizopus nigricans*: a. rizoizi; b. stolon; c. sporangiofor; d. columelă; e. spori.

Genul ***Mucor*** - cuprinde numeroase specii, în majoritatea lor saprofite şi numai puţine patogene.

Speciile genului ***Mucor*** se aseamănă foarte mult cu cele ale genului ***Rhizopus*** deosebindu-se doar prin culoarea sporangelui şi prin forma columelei. La speciile ***Mucor***, culoarea sporangelui este gălbuie, devenind brună la maturitate, iar columela este cilindrică.

Următoarele specii prezintă importanţă deosebită:

♦ *Mucor mucedo* (Fig. 39) - larg răspândit pe resturile organice în descompunere.

♦ *Mucor javanicus* - produce fermentaţia alcoolică.

♦ *Mucor rouxianus* - specie bogată în amilază din care cauză este utilizată la zaharificarea amidonului în fabricarea alcoolului etilic prin fermentaţie din substanţele amidonoase.

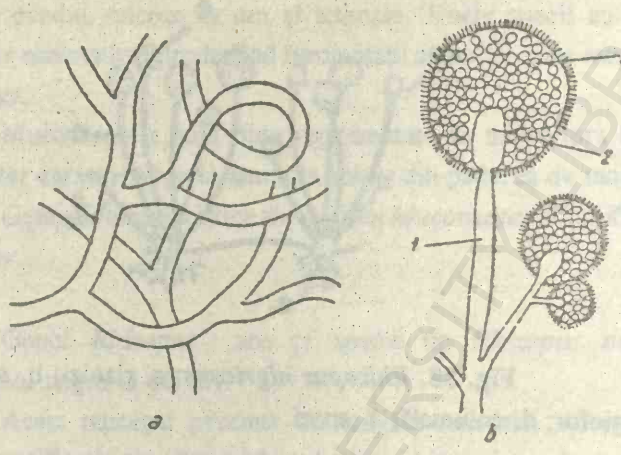


Fig. 39. Miceliul şi fructificaţiile la *Mucor mucedo*:
a. miceliu neseptat;
b. sporangi cu spori: 1 - sporangiofor, 2 - columelă, 3 - sporange cu spori.

Mucor corimbifer şi *Mucor italica* - specii patogene pentru om producând diferite abcese: pulmonare, intestinale, cerebrale.

Familia *Aspergillaceae*

În această familie sunt cuprinse ciuperci în majoritate saprofite care produc mucegaiuri albicioase, verzi sau negre, pe fructe, seminţe, diferite alimente. O serie de specii, mai puţine la număr, sunt parazite la plante, animale şi om.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reprezentanţii familiei prezintă un miceliu filamentos, ramificat şi septat. Organele de înmulţire asexuată sunt conidiile exogene care se formează pe conidiofori bine diferenţiaţi, de forme şi mărimi diferite.

Aspergilaceaele au importanţă practică deoarece multe specii produc antibiotice.

În cadrul familiei sunt cuprinse mai multe genuri dintre care reprezentative sunt: *Aspergillus* şi *Penicillium*.

Genul *Aspergillus* are ca specie tip *Aspergillus niger* (Fig. 40).

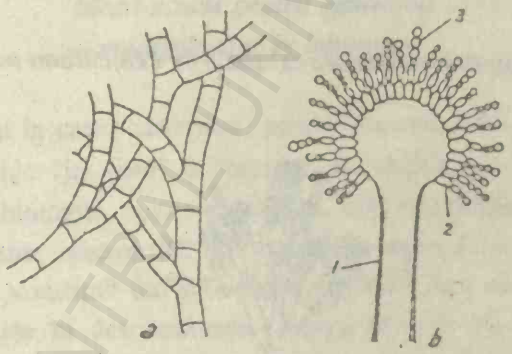


Fig. 40. Miceliul şi fructificaţiile la *Aspergillus niger*: a. miceliu septat; b. fructificaţii: 1 - sporangiofor, 2 - sterigme, 3 - conidii.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este caracterizat prin conidiofori simpli, măciucați. Pe conidiofori se inseră unul sau două rânduri de sterigme, care prin înmugurire formează lanțuri de conidii. Acestea pot fi de culoare verde (*Aspergillus glaucus*), neagră (*Aspergilius niger*).

Aspergillus niger este utilizat în industrie în producerea acidului citric prin fermentația glucidelor.

Aspergillus oryzae este utilizat în obținerea prin fermentație alcoolică a sucului de orez (băutura Saké).

Aspergillus fumigatus și *Aspergillus clavatus* produc antibiotice (fumigatina și clavacina).

Multe specii ale genului sunt producătoare de enzime (amilaze, proteaze, celulaze).

Genul *Penicillium* are ca specie tip *Penicillium notatum* (Fig. 41).

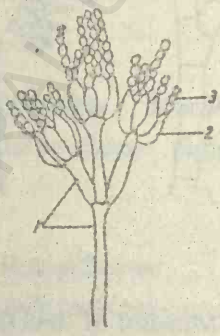


Fig. 41. Fructificațiile la *Penicillium notatum*: 1 - sporangiofor, 2 - sterigme, 3 - conidii.

BCU IAȘI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Caracteristic pentru speciile genului ***Penicillium*** este ramificarea digitiformă a conidioforilor în partea lor superioară, ceea ce le dă aspectul de pensule. Conidioforii sunt drepţi, nemăciucaţi şi pe ramurile lor se inseră unul sau două rânduri de sterigme care vor forma conidii mici, sferice, de culoare verde-cenuşie.

Multe specii au o mare importanţă industrială: ***Penicillium notatum*** şi ***Penicillium chrysogenum*** (producătoare de penicilină). ***Penicillium claviforme*** (produce antibioticul claviformina). Unele specii sunt utilizate în industria alimentară la prepararea brânzeturilor fine: ***Penicillium roqueforti*** (brânza de Roquefort) şi ***Penicillium camemberti*** (brânza de Camembert).

Medii uzuale pentru cultivarea mucegaiurilor în laborator

Ca şi în cazul bacteriilor, posibilitatea cultivării fungilor pe medii nutritive "in vitro" a constituit o condiţie esenţială pentru cunoaşterea biologiei acestor organisme. Toţi reprezentanţii fungilor sunt organisme heterotrofe. În natură, în general, substratul lor nutritiv este constituit din substanţele organice, mai ales de natură vegetală aflate în descompunere. Fungii paraziţi cel mai adesea necesită factori de creştere pe care îi furnizează ţesuturile vii ale organismelor gazdă.

Componentele generale ale mediilor nutritive

Apa de robinet este de cele mai multe ori preferată (în raport cu apa distilată) deoarece conţine microelementele necesare creşterii

mucegaiurilor.

Sursa de carbon este constituită de monozaharide, dizaharide, oligozaharide, polizaharide, acizi organici, aminoacizi, lipide.

Sursa de azot cuprinde o largă varietate de compuşi chimici anorganici (săruri de amoniu, nitriţi, nitraţi) sau organici (proteine, peptide, aminoacizi).

Elemente minerale (oligoelemente): P, K, Fe, Zn, Mg, Cu, Mn, Mo, Ca, Co se adaugă în mediul nutritiv în concentraţii mici sub forma unor compuşi ai acestora.

Medii cu utilizare curentă în laboratorul de micologie

Mediul cu amidon şi agar

amidon solubil	40	g
extract de levuri	5	g
agar	20	g
apă distilată	1.000	ml

Ingredientele se dizolvă la cald (fierbere). Mediul se repartizează şi se autoclavează la 121°C, timp de 15 minute.

Mediul cu cartof şi agar

cartofi	200	g
NaCl	1	g
agar	20	g
apă de robinet	1.000	ml

Cartofii se curăţă şi se fierb în 500 ml apă de robinet. Se

sfărâmă şi se filtrează prin tifon sau vată. Se adaugă celelalte ingrediente şi se dizolvă. Se repartizează şi se sterilizează la 121°C, timp de 20 minute.

Mediul cu roz Bengal

peptonă	5 g
glucoză	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
roz Bengal	0,33 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 5,6

Mediul se sterilizează timp de 20 minute la 110°C.

Mediul Czapek-Dox

Este un mediu standard pentru cultivarea speciilor din genul *Aspergillus* şi *Penicillium*. Mediul are următoarea compoziţie:

$NaNO_3$	2 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 . 2 H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4 . 7 H_2O$	0,01 g
glucoză (sau alt zahăr)	30 g
agar	15-20 g
apă distilată	1.000 ml

Se dizolvă toate componentele cu excepţia fosfatului, în 500 ml apă. Fosfatul se dizolvă separat şi se adaugă la restul soluţiei. Se completează volumul cu apă până la un litru.

pH-ul mediului trebuie să fie 5,6.

Sterilizarea se face timp de 20 minute la 115°C.

Pentru obţinerea de fructificaţii şi în scopul observării lor directe se foloseşte apa agarizată preparată astfel:

apă distilată	1.000 ml
agar	18 g

pH = 5-6

Sterilizarea se face 30 minute la 121°C.

Mediul se toarnă în strat relativ gros. În aceste condiţii se dezvoltă un miceliu sărac care produce fructificaţii tipice ce pot fi examinate direct pe placa Petri cu ajutorul unei lupe binocular.

Culturile de ***Penicillium notatum, Aspergillus niger, Rhizopus nigricans*** şi ***Mucor mucedo*** pot fi uşor observate în preparate pe lame de sticlă, pe care se realizează culturi de mucegaiuri.

<u>Materiale necesare:</u>

- Agar Sabouraud - repartizat în eprubete;
- lame de sticlă;
- lamele;
- lanolină;
- seringă de sticlă;
- pipete Pasteur;
- cutii Petri.

BCU IASI/CENTRUL UNIVERSITAR/BIBLIOTECA

Tehnica de lucru:

a) se alege o lamă de sticlă curată şi se flambează. Se lasă să se răcească;

b) în centrul lamei se depun două straturi de lanolină cu ajutorul unei seringi de sticlă (Fig. 42 a). Seringa se va păstra la 35°C, pentru ca lanolina să curgă mai uşor.

c) o lamelă curată se flambează şi se aşază peste cele două straturi cu lanolină (Fig. 42 b);

d) o eprubetă cu agar Sabouraud topit şi răcit până la 45-50°C se însămânţează cu una din culturile de ciuperci. Eprubeta se agită prin rotaţie între palme, pentru răspândirea uniformă în mediu a inoculului.

e) cu ajutorul unei pipete Pasteur se transferă în spaţiul dintre lamă şi lamelă (Fig. 42 c), o mică cantitate din acest agar însămânţat în aşa fel ca aproximativ jumătate din acest spaţiu să fie umplut cu agar.

f) lama astfel preparată se introduce într-o placă Petri (Fig. 42 d) şi se lasă pentru incubare la temperatura camerei timp de 2-4 zile.

În acelaşi mod se pot prepara culturile pe lamă şi pentru celelalte specii de mucegaiuri.

Lamelele sunt examinate la obiectivul de imersie şi se observă: miceliul, hifele septate sau neseptate, conidioforii cu conidii, sporangii şi sporangioforii.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

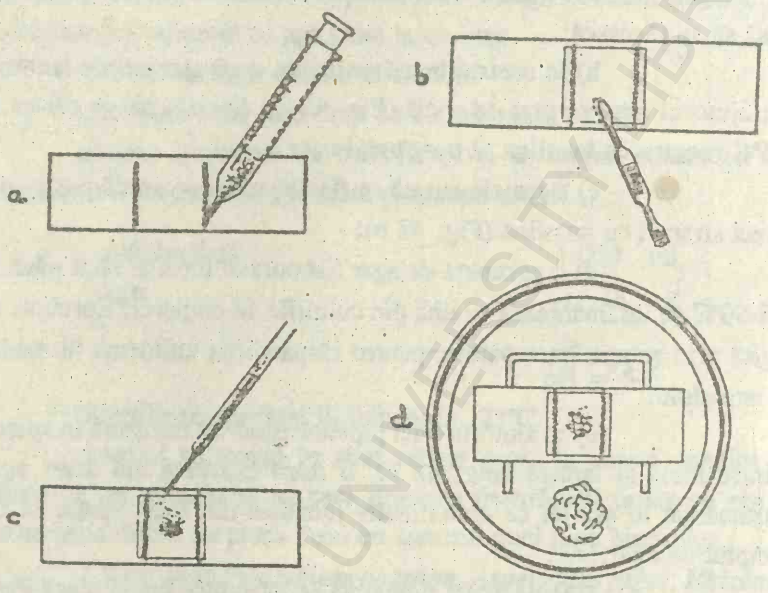


Fig. 42. Tehnica cultivării ciupercilor pe lame de sticlă:

a. Aşezarea stratului de lanolină pe lamă;

b. Aşezarea lamelei peste straturile de lanolină;

c. Introducerea unei cantităţi de mediu în spaţiul dintre lamă şi lamelă, cu ajutorul pipetei Pasteur;

d. Placă Petri sterilă cu preparatul pentru incubare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. METODE FOLOSITE ÎN STUDIUL FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE

Bacteriofagii se încadrează printre agenţii biologici cu efect distrugător asupra bacteriilor.

Fenomenul de bacteriofagie, are drept efect vizibil liza bacteriană.

Sistemul fag - bacterie se pretează foarte bine la investigarea fenomenelor în sistemul biologic al relaţiei virus - celulă gazdă şi aceasta pentru că bacteriile pot fi produse din abundenţă, repede, uşor şi economic.

Acţiunea bacteriofagică poate fi analizată în culturi pe bulion nutritiv sau pe agar nutritiv în plăci Petri.

Liza bacteriofagică manifestă aspecte diferite, după cum se petrece în mediu lichid sau pe mediu solid. În primul caz liza bacteriofagică se traduce prin clarificarea culturii. Dacă în populaţia bacteriană dezvoltată există şi variante fagorezistente, acestea supravieţuiesc şi vor tulbura din nou mediul, prin multiplicarea lor ulterioară.

În al doilea caz, când liza bacteriofagică are loc pe mediu solid, apar zone clare, lipsite de cultură pe locul unde a fost depus fagul. Aceste zone de liză sunt cunoscute sub numele de *plaje*.

Dimensiunile şi morfologia plajelor sunt caracteristice pentru diferite sisteme fago-bacteriene şi pot varia pentru diferiţi fagi crescuţi pe aceeaşi cultură gazdă sau pentru acelaşi fag crescut pe diferite gazde bacteriene.

Dimensiunile plajelor cresc în timpul incubaţiei, atingând un maxim după 8-12 ore. Prin confluarea mai multor plaje se produc

zone de liză confluentă. În cazul în care, în populaţia microbiană există variante fagorezistente, acestea vor dezvolta colonii pe aria de liză.

Proprietăţile bacteriofagilor

1. Specificitatea - constituie o importantă caracteristică a bacteriofagilor. Fiecare tulpină bacteriană îşi poate avea fagul său omolog.

2. Adaptabilitatea - este proprietatea unui bacteriofag de a se adapta, de a deveni activ faţă de o tulpină microbiană după cultivări repetate în prezenţa acelei tulpini.

3. Polivalenţa - capacitatea unui fag de a liza numeroase tulpini din specii bacteriene diferite.

4. Monovalenţa - capacitatea unui fag de a liza în mod specific numai tulpini aparţinând aceleiaşi specii bacteriene.

În studiul fenomenului de bacteriofagie trebuie să se ia în considerare o serie de principii generale:

- pentru multiplicarea fagilor se folosesc culturi tinere de bacterii, în faza de multiplicare logaritmică (culturi de 2-3 ore în mediu lichid, obţinute la rândul lor prin subcultivarea unor culturi în bulion de 24 ore);

- mediile de cultură să fie potrivite ca pH şi conţinut nutritiv faţă de cerinţele nutritive specifice culturilor indicatoare şi fagilor respectivi;

- să se respecte particularităţile biologice şi de rezistenţă a fagilor în studiu, faţă de agenţii fizici şi chimici.

13.1. DETERMINAREA SENSIBILITĂŢII LA BACTERIOFAGI A UNEI TULPINI BACTERIENE

Din tulpina de cercetat se fac culturi în bulion în vârstă de 1-3 ore, obţinute la rândul lor prin subcultivarea unor culturi în bulion de 24 ore. Ca mediu de cultură se foloseşte agarul nutritiv (1,5 - 2 g%, pH = 7 - 7,2) turnat în plăci Petri.

Plăcile cu agar se păstrează în prealabil timp de 20-24 ore la 37°C pentru uscare şi controlul sterilităţii.

Însămânţarea culturilor tinere de cercetat se face fie sub formă de arii (rotunde sau dreptunghiulare), fie prin răspândirea culturii în strat uniform pe toată placa şi ridicarea excesului de cultură cu ajutorul unei pipete Pasteur (Fig. 43).

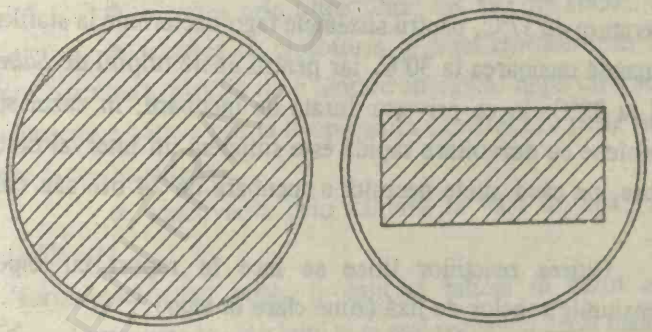


Fig. 43. Forma ariilor de însămânţare a culturilor de cercetat.

Înainte de însămânțare se desenează pe fundul plăcilor conturul ariilor pe care urmează să se depună cultura și fagii, împreună cu indicațiile acestora.

După însămânțarea culturilor, plăcile se țin în termostat la 37°C, cu capacul întredeschis până când agarul absoarbe complet cultura, după care pe ariile însămânțate se depun preparatele fagice (în diluții diferite), câte o picătură, cu ajutorul unei anse cu bucla foarte fină.

Plăcile se lasă pe masa de lucru până când picăturile de fag sunt absorbite de mediul de cultură, după care se incubează la termostat cu capacul în jos.

Temperatura de incubare, și durata acesteia sunt variabile în raport cu particularitățile de creștere a speciei microbiene de cercetat.

Astfel, dacă pentru majoritatea speciilor bacteriene se folosește temperatura de 37°C, pentru sistemele fago-bacteriene la stafilococi se recomandă incubarea la 30°C, iar pentru unele tulpini de *Salmonella typhi* la 38°C. În ce privește durata de incubare, în cazul speciilor microbiene cu dezvoltare rapidă este suficient un interval de timp de 5-6 ore, pe când altele necesită o incubare de 24 ore sau chiar mai mult.

Citirea reacțiilor litice se face în raport cu aspectul și dimensiunile zonelor de liză (zone clare în agar).

13.2. IZOLAREA BACTERIOFAGILOR

Sursele de izolare a bacteriofagilor sunt reprezentate de diverse materiale bogate în bacterii (apa de canal, soi), cât și de

bacterii lizogene.

Prezența bacteriofagilor poate fi pusă în evidență de asemenea în diferite produse printre care: urină, materii fecale, exudate purulente etc.

13.2.1. Metoda directă de izolare

Izolarea din diferite produse

Se însămânțează produsul de cercetat (aproximativ 1 g materii fecale, 1 ml urină, 1 ml exudat) în 30-50 ml bulion. După o incubare de 18-24 ore la 37°C, lizatul obținut se filtrează prin hârtie de filtru sau se centrifughează la 2000-3000 rotații/minut pentru îndepărtarea particulelor mari. Pentru îndepărtarea sau inactivarea bacteriilor din lichidul obținut se folosesc următoarele procedee:

- filtrarea prin filtre Seitz, EK sau din sticlă;
- tratarea cu cloroform (0,5 ml cloroform la 10-20 ml amestec incubat), urmată de o agitare energică, după care se lasă să se limpezească câteva ore la temperatura camerei sau peste noapte la frigider și se decantează;
- inactivarea prin căldură la baia de apă, 30-60 minute la 59-60°C.

Termoinactivarea poate fi aplicată numai în cazul acelor sisteme fago-bacteriene în care fagii sunt mai rezistenți decât bacteriile omoloage, de exemplu *Escherichia coli, Salmonella* etc.

Filtratul sau produsul inactivat urmează să fie testat pentru activitatea sa litică față de tulpini lizosensibile bine cunoscute (tulpini indicatoare).

Tulpinile indicatoare test sunt folosite în culturi tinere în bulion, în vârstă de 1-3 ore, metoda de testare fiind identică cu cea expusă mai sus pentru testarea lizosensibilității unei tulpini microbiene.

b) Izolarea bacteriofagilor din apă

Se însămânțează în 30 ml bulion, un volum egal din apa de cercetat. Amestecul este incubat la 37°C timp de 18-24 ore, după care este filtrat sau, la nevoie, inactivat 60 minute la 60°C. Produsul obținut este apoi testat pentru prezența fagului litic față de tulpini indicatoare cunoscute.

c) Izolarea din sol

Într-un balon care conține aproximativ 100 ml mediu nutritiv lichid (bulion de carne) se adaugă 20-25 g sol. Acest amestec se însămânțează apoi cu bacteria de studiat. Incubarea se face la 28°C timp de 48 ore după care amestecul se filtrează prin hârtie de filtru dublă, pentru îndepărtarea celulelor bacteriene.

d) Izolarea din culturi lizogene

Se însămânțează bacteria lizogenă în bulion de carne. Dacă se folosește specia ***Escherichia coli*** se recomandă un mediu nutritiv cu următoarea compoziție (DREWS, 1968):

bacto-triptonă	5 g
proteoză-peptonă	5 g
cazeină-peptonă	2 g
NH_4Cl	2 g
glucoză	8 g
citrat de sodiu	2 g
$MgCl_2 . 6 H_2O$	0,2 g
K_2HPO_4	2 g
NaCl	2 g
extract de drojdii	0,1 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 7,0

Cultivarea are loc timp de 16 ore la 30°C. Prin centrifugare timp de 30 minute la 3000 rotații/min, sau prin fitrare prin filtru Seitz, bacteriile se îndepărtează. Produsul obținut este apoi testat pentru prezența fagului, față de tulpini indicatoare cunoscute.

13.2.2. Metoda prin multiplicare

Această metodă se folosește în cazul produselor care conțin cantități foarte mici de fag ce nu pot fi puse în evidență prin metoda directă.

Principiul metodei constă în adăugarea la bulionul însămânțat cu produsul de cercetat, a câtorva picături din cultura tânără în bulion a unei tulpini lizosensibile indicatoare.

Mai departe tehnica de lucru este identică cu cea expusă la

metoda directă.

Multiplicarea poate fi monovalentă (cu o singură tulpină indicatoare) sau polivalentă (amestec de mai multe tulpini indicatoare). De asemenea poate fi unică sau repetată.

În cazul multiplicărilor repetate, produsul poate fi filtrat sau termoinactivat şi apoi testat după fiecare multiplicare în parte sau se pot face 5-10 multiplicări zilnice, după care se procedează la filtrare sau termoinactivare şi testare faţă de tulpinile indicatoare respective.

13.3. TITRAREA BACTERIOFAGILOR

Se efectuează diluţii zecimale în bulion, ser fiziologic sau soluţie tampon, din bacteriofagul de cercetat schimbând pipeta la fiecare diluţie. Apoi se foloseşte unul din procedeele următoare:

a) Pe suprafaţa unei plăci Petri cu agar se însămânţează tulpina lizosensibilă omoloagă prin răspândirea culturii pe întreaga suprafaţă a mediului şi îndepărtarea excesului. După uscarea suprafeţei însămânţate, se depune în dreptul ariilor desenate pe fundul plăcii câte o picătură din fiecare diluţie de fag. Incubarea se face la 37°C.

Citirea rezultatelor: se face după următoarele criterii. Se socoteşte drept titru al bacteriofagului cercetat, ultima diluţie capabilă să producă minimum o plajă.

b) **Metoda dublului strat de agar** - se pregătesc atâtea plăci cu agar 2% câte diluţii de fag s-au efectuat.

Paralel, se repartizează într-un număr de tuburi de hemoliză câte 0,5 ml din fiecare diluţie de fag realizată, peste care se adaugă

câte 0,5 ml din cultura tânără (18 ore) în bulion a tulpinii sensibile. În fiecare tub se introduce apoi câte 1 ml mediu cu agar moale, topit şi răcit la 45-50°C. Se omogenizează, după care amestecul din fiecare eprubetă se toarnă în câte o placă Petri cu agar 2% pregătită în prealabil.

Plăcile se incubează timp de 24 ore la 37°C după care se citesc rezultatele. Se numără plajele de liză din fiecare placă Petri. Numărul aflat se înmulţeşte cu diluţia, exprimându-se astfel titrul bacteriofagilor la 1 ml de filtrat.

13.4. APLICAŢIILE PRACTICE ALE FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE

Aplicaţii în epidemiologie

Printre numeroasele aplicaţii practice ale fenomenului de bacteriofagie, cele mai importante sunt acelea din domeniul epidemiologiei.

Comportarea deosebită faţă de diferiţi bacteriofagi a unor tulpini aparţinând aceleiaşi specii bacteriene a făcut posibilă diferenţierea de tipuri bacteriofagice, printre tulpini care biochimic şi serologic se prezentau întrutotul identice.

Bazată pe acest principiu, determinarea tipului fagic (lizotipia) a devenit o metodă de investigaţie larg folosită în epidemiologia unor boli infecţioase, pentru stabilirea sursei de infecţie, oferind posibilitatea de a se urmări originea şi filiaţiunea cazurilor într-un focar epidemic.

În prezent, se foloseşte cu succes lizotipia la *Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A şi B, Salmonella typhimurium,* stafilococi, pentru care metoda de lucru este standardizată.

O altă aplicaţie practică a fenomenului de bacteriofagie în studiile epidemiologice este folosirea bacteriofagilor ca indicatori ai stării sanitare, ai gradului de poluare a apelor.

S-a stabilit că apariţia bacteriofagului în apele curgătoare este în strânsă legătură cu starea igienică a regiunilor pe care le traversează. Adaptaţi la flora microbiană bogată a apelor poluate, bacteriofagii izolaţi din aceste ape sunt însă deosebit de polivalenţi şi prin aceasta, indicaţiile pe care le poate oferi izolarea lor sunt minore. O importanţă epidemiologică seminficativă are numai izolarea bacteriofagilor antitifici "Vi" capabili să se multiplice numai pe tulpina care posedă antigenul "Vi".

Izolarea dintr-o apă a unui fag strict "Vi" poate da indicaţii asupra prezenţei *Salmonella typhi* în acea apă, dat fiind faptul că antigenul "Vi" este rar întâlnit la alte specii microbiene în afară de *Salmonella typhi.*

În acest fel, prezenţa fagului poate da indicaţii valabile în descoperirea originii hidrice şi a căilor de transmitere în epidemii de febră tifoidă.

Valabilitatea rezultatelor este însă condiţionată de calitatea tulpinilor indicatoare, folosite pentru izolarea fagilor.

Aplicaţii în scop diagnostic

Metoda este recomandată ca o completare a diagnosticului serologic şi a început să fie extinsă la mai multe grupuri de germeni:

al Salmonelelor, *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides.*

14. STUDIUL PRINCIPALILOR FACTORI CARE CONDIŢIONEAZĂ STAREA DE IMUNITATE

Imunitatea este nereceptivitatea sau rezistenţa organismului faţă de un agent infecţios sau faţă de o anumită substanţă străină. Această stare de nereceptivitate este condiţionată de ansamblul tuturor adaptărilor organismului transmise pe cale ereditară sau câştigate în cursul vieţii individuale, precum şi de totalitatea proceselor care tind să restabilească constanţa mediului intern al organismului.

Aparatul defensiv antimicrobian cu care organismele sunt înzestrate este constituit dintr-o serie de factori, care după felul cum intervin în apărarea organismelor pot fi clasificaţi astfel:

A. Factori de apărare pasivi: tegumentul, mucoasele, tensiunea O_2 în ţesuturi, indiferenţa ţesuturilor faţă de toxinele microbiene etc.;

B. Factori de apărare activi, care se împart la rândul lor în:

a. factori de apărare activi de natură celulară - fagocitoza şi pinocitoza;

b. factori de apărare activi de natură umorală - specifici (anticorpii) şi nespecifici (lizozimul, inhibina, sistemul alexină - properdină, conglutinina, interferonul etc.).

14.1. FACTORII CELULARI AI IMUNITĂŢII (IMUNITATEA CELULARĂ)

Imunitatea celulară reprezintă unul din principalele mijloace de apărare ale organismului uman sau animal faţă de pătrunderea unui agent străin microbian sau de altă natură.

În apărarea contra agenţilor străini organismul utilizează două mecanisme deosebit de importante şi anume: **fagocitoza** (înglobarea de elemente corpusculare) şi **pinocitoza** (înglobarea de macromolecule).

Fagocitoza reprezintă un proces complex ce cuprinde o serie de faze ce duc la înglobarea şi digerarea intracelulară a particulelor străine pătrunse în organism, atunci când natura chimică a acestora o permite. Proprietatea de a fagocita o au anumite celule "libere" sau "fixe" ale organismului numite **fagocite**.

Ansamblul tuturor celulelor cu proprietăţi fagocitare constituie **aparatul (sistemul) fagocitar**. Acesta este reprezentat de celule cu morfologie variată şi localizări diferite dar având comună capacitatea de fagocitoză şi pinocitoză.

14.1.1. Principalele tipuri de celule cu proprietăţi fagocitare

FAGOCITE:

I. MOBILE (din sângele circulant):

a) *microfage*:

- polimorfonucleare (granulocite):

BCU IASI CENTRAL LIBRARY

- ♦ neutrofile;
- ♦ eozinofile;

b) *macrofage*:

- mononucleare (agranulocite):
  - ♦ monocite;

II. TISULARE (elemente ale S.R.E.):

a) *macrofage "călătoare"*:

- histiocit:
  - ♦ macrofag tisular;
- monocit sanguin;

b) *celule reticulo-endoteliale "fixe"*:

- celule endoteliale din sinusurile sanguine din:
  - ♦ ficat (celule Kupffer);
  - ♦ splină;
  - ♦ măduvă osoasă;
  - ♦ hipofiza anterioară;
  - ♦ cortex suprarenal;
- microglia (sistem nervos central);
- celule reticulare din sinusurile limfatice din:
  - ♦ ganglioni limfatici;
  - ♦ foliculi limfatici (plăci Peyer);
  - ♦ amigdale;
  - ♦ splină;
  - ♦ timus.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru observarea fagocitelor din sângele circulant se fac frotiuri de sânge recoltat din pulpa degetului.

Materiale necesare:

- lame de sticlă;
- cristalizoare cu capac;
- baie de colorat Laveran;
- alcool metilic;
- soluţie May-Grünwald;
- soluţie Giemsa;
- apă distilată neutră.

Metoda de lucru:

Se recoltează o picătură proaspătă de sânge pe faţa inferioară a extremităţii libere a unei lame curate şi foarte bine degresată. Lama pe care s-a făcut recoltarea este sprijinită cu marginea inferioară pe extremitatea dreaptă a lamei orizontale, în aşa fel încât să formeze cu aceasta un unghi de 45°C (Fig. 44). Stratul de sânge obţinut trebuie să fie subţire si cel puţin una din marginile frotiului să fie dreaptă şi să păstreze o anumită distanţă până la marginea lamei. Frotiurile se usucă prin agitare în mână.

Colorarea frotiurilor de sânge se face prin metoda May-Grünwald-Giemsa. Se recomandă colorarea lor imediat după uscare. În frotiurile de sânge nefixate şi necolorate, celulele se alterează şi îşi pierd afinitatea tinctorială.

BCU IASI/OLD UNIVERSITY LIBRARY

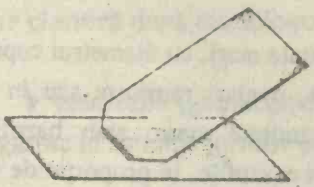


Fig. 44. Întinderea frotiului de sânge.

Tehnica coloraţiei:

Frotiul de sânge bine uscat se acoperă cu 15-20 picături din soluţia May-Grünwald (care se găseşte gata preparată). După 3 minute se adaugă peste această soluţie acelaşi număr de picături de apă distilată neutră şi se lasă încă 2 minute. Apa distilată neutră cu pH = 7 - 7,2 se obţine prin neutralizarea apei distilate care are un pH acid, cu o soluţie de carbonat de sodiu 1%. Se controlează pH-ul cu un indicator universal de hârtie.

Colorarea se face în cristalizoare sau în băi speciale de colorare (tip Laveran). Soluţia May-Grünwald realizează fixarea frotiului şi totodată colorarea elementelor acidofile şi a granulaţiilor neutrofile ale leucocitelor. Se varsă primul colorant şi se introduc lamele într-o baie cu soluţie Giemsa diluată astfel: 1 ml apă distilată neutră şi 2 picături colorant. Frotiurile se menţin în această baie 15-30 minute, după care se spală cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la imersie. Examinarea se face la marginea frotiului unde fagocitele (leucocitele) din sânge sunt bine conservate şi în număr mai mare.

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

Fagocitele (leucocitele) mononucleare (agranulocite)

Monocitele sunt celule mari, cu diametrul cuprins între 15-25 μm, cu nucleul voluminos, ovalar, reniform sau în potcoavă, slab colorat. Citoplasma în cantitate mare, slab bazofilă, de nuanță spălăcită, cu rare granulații azurofile, în proporție de 4-5%. Monocitele trec și în spațiile extravasculare jucând rol de macrofage (Fig. 45 a).

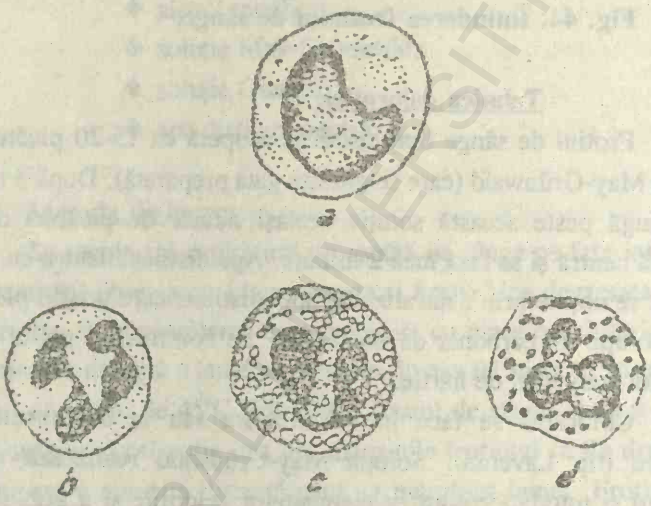


Fig. 45. Tipuri de fagocite din sânge: a. monocit; b. granulocit neutrofil; c. granulocit eozinofil; d. granulocit bazofil.

Fagocitele (leucocitele) polinucleare (granulocite)

Au un nucleu cu aspect polimorf, fragmentat în 2-6 lobi, uniți unul de altul prin câte un fir subțire de cromatină. Nucleul este colorat

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în violet. Citoplasma uşor acidofilă conţine granulaţii specifice. Granulocitele se clasifică după morfologia şi afinitatea lor tinctorială în:

♦ neutrofile (granulaţiile din citoplasmă de culoare violet-roz), se găsesc în condiţii normale în proporţie de 65-70% (Fig. 45 b);

♦ eozinofile (acidofile) se găsesc în proproţie de 1-3% (Fig. 45 c);

♦ bazofile, cu granulaţii puţine în citoplasmă, de culoare violet-neagră, care uneori se suprapun şi peste nucleu; se găsesc în proporţie de 0,5 - 1% (Fig. 45 d).

Neutrofilele au ca funcţie importantă fagocitarea bacteriană. Datorită prezenţei lor în sânge în număr mare, migrării şi mobilizării lor rapide ca urmare a chimiotactismului lor, ele constituie prima linie a apărării celulare.

Leucocitele eozinofile au capacitate fagocitară mai redusă.

14.1.2. Studiul fenomenului de fagocitoză

Mişcarea leucocitelor şi înglobarea microbilor pot fi urmărite prin metode mai simple sau mai complicate.

O metodă simplă este observarea fenomenului direct într-o picătură de sânge. Pe o lamă de microscop se aşază o picătură dintr-o suspensie de stafilococ care se lasă să se usuce, iar pe o lamelă se pune o picătură de sânge obţinută prin înţeparea degetului. Se aşază apoi lamela pe lamă în aşa fel ca să se formeze un strat subţire de sânge între lamă şi lamelă. Lamela se lipeşte pe margini cu vaselină

sau cu parafină cu punct de topire 56°C, cu ajutorul unei spatule încălzite, pentru a împiedica evaporarea sângelui. La un microscop cu platina încălzită la 37°C se vor observa mişcările amoeboidale ale polimorfonuclearelor în direcţia stafilococilor pe care-i înglobează.

Punerea în evidenţă a fagocitozei "in vivo" şi "in vitro"

Pentru punerea în evidenţă a fagocitozei "in vivo" se procedează mai întâi la obţinerea unui exudat leucocitar. Se inoculează intraperitoneal la cobai, în două reprize, apă peptonată: prima inoculare se face cu 20 ml, iar cea de a doua, după un interval de 2-3 ore, se face cu 10 ml apă peptonată.

După 2 ore de la ultima inoculare de apă peptonată, cobaii sunt injectaţi, tot intraperitoneal, cu 5 ml suspensie de stafilococ, inactivată în prealabil timp de 30 minute la 60°C. La un interval de 30 minute de la inocularea suspensiei bacteriene, se extrage prin puncţie exudatul peritoneal, în soluţie anticoagulantă (citrat de Na 2,5%) din care prin centrifugare se separă leucocitele. Depozitul de leucocite obţinut se spală de 2-3 ori în soluţie fiziologică (soluţie salină 0,85%) şi se readuce, în final, în suspensie. Din această suspensie se fac frotiuri, se colorează prin metoda May-Grünwald-Giemsa şi se examinează la imersie pentru a observa numărul de celule de stafilococ înglobate în citoplasma fagocitelor.

Pentru punerea în evidenţă a fagocitozei "in vitro", exudatul leucocitar se obţine prin procedeul prezentat anterior.

Într-o eprubetă se amestecă în volume egale suspensia de

leucocite spălate, suspensia de stafilococ şi ser proaspăt de cobai care conţine opsonine (anticorpi naturali care facilitează fagocitoza). După o bună amestecare a conţinutului, eprubeta se introduce în termostat la 37°C, având grijă să se agite uşor amestecul din 10 în 10 minute.

Pentru urmărirea etapelor procesului de fagocitoză (mobilizarea leucocitului spre corpul fagocitabil, adeziunea şi înglobarea) se execută frotiuri la diferite intervale de timp (15, 20, 30 şi 45 minute) care se colorează şi se examinează la imersie.

14.1.3. Determinarea indicelui opsono-citofagic, ca interrelaţie între procesele celulare şi cele umorale de imunitate

Interrelaţia dintre procesele celulare de imunitate şi cele umorale a fost stabilită încă din 1895, când s-a semnalat pentru prima dată prezenţa în serurile imune a unor substanţe cu acţiune sensibilizantă asupra bacteriilor, făcându-le astfel mai uşor fagocitabile. Mai târziu s-a constatat că substanţe cu aceeaşi acţiune de sensibilizare a bacteriilor pentru procesul fagocitar se găsesc şi în serul normal. Aceste substanţe au fost denumite **opsonine** (de la cuvântul grecesc "opsao" = pregătesc pentru mâncare).

Opsoninele din serul imun (imunoopsoninele) sunt termostabile, au acţiune specifică asupra bacteriilor şi se deosebesc de opsoninele prezente în serul normal care sunt termolabile şi au acţiune asupra bacteriilor în general şi mai puţin asupra unei anumite bacterii care a produs infecţia.

Puterea opsonizantă a unui ser se pune în evidenţă prin determinarea indicelui opsono-citofagic.

Tehnica reacţiei opsono-citofagice

Elemente necesare: leucocite obţinute din sângele uman sau exudat peritoneal de cobai; suspensia microbiană (între 1 şi 4 miliarde celule bacteriene pe ml, în funcţie de bacteria aleasă); serul de cercetat; serul normal-martor).

Prepararea leucocitelor. În cazul folosirii leucocitelor din sângele uman, se va înţepa cu un ac de seringă steril pulpa degetului şi se recoltează cca 20 picături de sânge în soluţie anticoagulantă în proporţie de 8 părţi soluţie şi o parte sânge. Soluţia anticoagulantă se prepară din clorură de sodiu 8,5 g, citrat de sodiu 15 g, apă distilată 1.000 ml.

Amestecul de sânge şi soluţia anticoagulantă se centrifughează, se îndepărtează supernatantul, iar depozitul se spală de 3 ori, prin centrifugare, cu câte 10 ml ser fiziologic. Se îndepărtează lichidul de spălare. Depozitul rămas va prezenta un strat superficial format din leucocite şi un strat profund format din globule roşii. Se înclină tubul şi se aspiră leucocitele cu o pipetă bine efilată, apoi se depun într-un tub cu diametrul mic.

Pentru obţinerea leucocitelor de cobai se provoacă un exudat peritoneal, prin inocularea intraperitoneală a 30 ml bulion steril sau apă peptonată sterilă. După 1-2 ore se punctionează peritoneul cobaiului şi se recoltează exudatul bogat în leucocite. Recoltarea se face tot în soluţie anticoagulantă, iar leucocitele obţinute sunt spălate prin centrifugare cu soluţie salină, ca şi în cazul leucocitelor din sânge.

Prepararea suspensiei microbiene. Din cultura tânără de 12-24 ore a tulpinii bacteriene dezvoltată pe mediu solid, se prepară o suspensie în soluţie fiziologică care să fie cât mai omogenă şi opalescentă.

Serul de cercetat. Sângele recoltat se lasă la termostat 2-3 ore, pentru separarea cheagului de ser. Serul obţinut se poate păstra la frigider 3-4 zile. Serul martor (normal) se recoltează de la un individ sănătos, folosind aceeaşi tehnică.

Tehnica reacţiei. Se amestecă, în cantităţi egale, serul, suspensia de germeni şi leucocitele. Se termostatează amestecul timp de 30 minute la 37°C. Concomitent se face acelaşi amestec folosind în locul serului de cercetat un ser normal martor. Din aceste amestecuri se fac frotiuri pe lame curate, degresate, se fixează în alcool absolut şi se colorează cu albastru de toluidină sau soluţie Giemsa. În cazul speciei *Mycobacterium tuberculosis* se utilizează coloraţia Ziehl-Neelsen (încălzirea efectuându-se la 37°C).

Citirea rezultatelor. Se examinează 100 leucocite polimorfonucleare, făcându-se suma numărului microbilor conţinuţi în fiecare leucocit. În cazul unui leucocit care nu a fagocitat nimic, se scrie la calcul 0. Suspensia microbiană este bine făcută când se obţine la martor un număr de 2-4 microbi fagocitaţi pe leucocit. Notarea se va face numai pentru leucocitele bine colorate şi distincte. În cazul unei fagocitări intense, când microbii sunt în număr prea mare şi nu pot fi număraţi se va scrie întotdeauna cifra 9.

Puterea opsonică a serului rezultă din împărţirea numărului de microbi găsiţi în 100 de polimorfonucleare, la 100.

Indicele opsonocitofagic se determină din raportul dintre

puterea opsonică a serului de cercetat şi puterea opsonică a serului martor (normal).

Exemplu: dacă în 100 de leucocite poiimorfonucleare s-au găsit 300 microbi, atunci puterea opsonică a serului cercetat va fi:

$$\frac{300}{100} = 3$$

Dacă serul normal are puterea opsonică 2 şi serul de cercetat are puterea opsonică 3, indicele opsono-citofagic va fi egal cu:

$$\frac{\textit{puterea opsonica a serului cercetat}}{\textit{puterea opsonica a serului martor}} = \frac{3}{2} = 1{,}5$$

Indicele opsono-citofagic se foloseşte în scop diagnostic şi prognostic în unele infecţii (aprecierea evoluţiei unei infecţii).

14.2. REACŢIILE DINTRE ANTIGEN ŞI ANTICORP (REACŢII SEROLOGICE)

În afara organismului ("in vitro"), atunci când punem în prezenţă serul unui animal imunizat cu antigenul care a servit la imunizare sau serul unui bolnav cu microorganismul care a produs infecţia ori cu produsele lui toxice, acţiunea antagonistă a anticorpilor din acest ser se manifestă în diferite moduri şi este cunoscută sub numele de **reacţie antigen-anticorp (Atg-Atc)**. Acţiunea dintre Atg şi Atc poate fi uşor pusă în evidenţă prin reacţii serologice.

Aspectul pe care îl îmbracă reacţia dintre antigen şi anticorp este variat în funcţie de natura antigenului:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

♦ dacă antigenul este reprezentat de o suspensie de celule bacteriene, sub acțiunea anticorpilor specifici se produce o aglomerare (aglutinare) treptată a celulelor bacteriene cu formarea unor granule vizibile cu ochiul liber, ce se depun pe fundul tubului de reacție. În acest caz, reacția dintre antigen și anticorp poartă numele de reacție de aglutinare (seroaglutinare). Antigenul este denumit aglutinogen iar anticorpii aglutinine;

♦ când antigenul este reprezentat de o soluție coloidală, sub acțiunea anticorpilor se formează un precipitat vizibil care se depune. Reacția dintre antigen și anticorp poartă, în acest caz, numele de reacție de precipitare (seroprecipitare). Antigenul este denumit precipitinogen, iar anticorpii precipitine;

♦ când antigenul este alcătuit din celule lizabile (corpi microbieni sau hematii) și dacă reacția are loc în prezența complementului (alexinei), atunci sub acțiunea anticorpilor specifici se produce imunocitoliza (bacterioliza sau hemoliza). Reacțiile care au loc în acest caz poartă numele de reacții de liză, iar anticorpii de lizine (bacteriolizine și hemolizine);

♦ dacă antigenul este o substanță toxică (o toxină microbiană), acțiunea ei toxică poate fi neutralizată sub acțiunea anticorpilor denumiți antitoxine. Reacția poartă numele de reacție de neutralizare (seroneutralizare).

Reacțiile dintre antigen și anticorp pot fi evidențiate calitativ și cantitativ. Reacțiile cantitative permit evaluarea titrului anticorpilor prezenți într-un ser.

Prin titrul anticorpilor într-un ser se înțelege diluția maximă a serului care mai dă o reacție pozitivă cu o cantitate cunoscută,

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

constantă, a antigenului corespunzător.

Reacţiile antigen-anticorp au o largă utilizare în practică.

Aplicaţiile reacţiei decurg din însăşi specificitatea ei:

- un antigen necunoscut poate fi identificat prin anticorpul corespunzător cunoscut. În acest scop sunt utilizate seruri de referinţă (seruri imune cu anticorpi cunoscuţi, destinate identificării unor antigene):
- un anticorp necunoscut poate fi identificat prin antigenul corespunzător (antigen de referinţă).

14.2.1. Reacţia de aglutinare (seroaglutinare)

Există mai multe modalităţi tehnice de efectuare a acestei reacţii.

14.2.1.1. Reacţia de aglutinare în tuburi (reacţie cantitativă)

Reacţia pentru identificarea unui anticorp necunoscut.

Elemente necesare reacţiei:

- tuburi (eprubete) de aglutinare;
- antigenul (o suspensie bacteriană standardizată nefelometric);

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- serul de cercetat;
- soluţie cloruro-sodică 8,5 g ‰;
- pipete gradate;
- baie de apă.

Tehnica reacţiei. Se aşază un număr de tuburi de aglutinare în stativ, în raport cu numărul diluţiilor de ser pe care dorim să le realizăm. Se notează pe fiecare tub diluţiile finale de ser. Ultimul tub din serie va servi drept martor (M). Se repartizează câte 0,5 ml soluţie cloruro-sodică începând cu al doilea tub al seriei, inclusiv tubul martor. Într-o eprubetă separată se face diluţia iniţială a serului de cercetat 1/10 (1 ml ser + 9 ml soluţie cloruro-sodică). Din această diluţie de ser se vor repartiza câte 0,5 ml în tuburile 1 şi 2. Din tubul 2 se va lua 0,5 ml amestec şi se va trece în tubul 3. Se repetă această operaţie şi în celelalte tuburi până la penultimul tub din serie, din care, după amestecare, se scot şi se aruncă 0,5 ml. Ultimul tub (tubul martor) nu conţine ser de cercetat. Se adaugă apoi în toate tuburile de reacţie câte 0,5 ml antigen (diluat în mod diferit în funcţie de antigenul utilizat). Cantitatea finală de amestec în toate tuburile va fi de 1 ml. Tubul martor conţine numai soluţie NaCl şi antigenul. El foloseşte şi la controlul antigenului folosit în reacţie, care uneori poate da aglutinări spontane ce conduc la rezultate false (Tabelul 4).

BCU IASI/CET

Tabelul 4

Schema reacţiei de aglutinare în tuburi

Componentele de reacţie	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Soluţie cloruro-sodică 8,5‰ (ml)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser de cercetat diluat 1/10 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Antigen (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluţiile finale de ser	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	-

După repartizarea suspensiei microbiene, tuburile se agită şi se incubează la termostat sau la baia de apă. Temperatura şi timpul de incubare variază cu antigenul. În general, temperatura de incubare este de 37°C, iar timpul de 2 ore pentru reacţiile cu antigene flagelare şi 20 ore pentru cele cu antigene somatice.

Citirea rezultatelor: se face cu ochiul liber sau cu aglutinoscopul. O primă citire se face după scoaterea tuburilor din termostat (sau baia de apă) şi o citire definitivă după 24 ore.

În tubul martor suspensia bacteriană trebuie să fie omogenă

În tuburile în care reacţia este pozitivă, bacteriile sunt aglutinate, depuse pe fundul tubului, iar lichidul de deasupra este clar. În tuburile în care nu s-a produs aglutinarea, ca şi în tubul martor, suspensia bacteriană rămâne omogen-opalescentă, fără depozit. Pentru examinare, tuburile vor fi uşor agitate.

Gradul de pozitivitate a reacţiei se notează astfel:

++++ = pentru o aglutinare completă, lichid clar;

+++ = lichid clar sau aproape clar, depozit însemnat;

++ = lichid neclar, depozit mic;

+ = lichid neclar, depozit neînsemnat;

± = reacţie îndoielnică;

- = absenţa aglutinării, suspensia omogen-tulbure;

Diluţia maximă a serului la care mai apare fenomenul de aglutinare, reprezintă titrul aglutinant al serului cercetat. Aceasta constituie în practica curentă de laborator, modul concret de apreciere cantitativă a aglutininelor.

Reacţia de aglutinare în tuburi este larg folosită ca reacţie de diagnostic: diagnosticul salmonelozelor, brucelozei, tularemiei, colibacilozei etc.

Reacţia de aglutinare poartă numele diferiţilor autori care au introdus-o ca metodă de diagnostic la diferite specii microbiene (reacţia Widal, reacţia Wright, Weill-Felix etc.).

BCU IAŞI/CENTRA UNIVERSITARĂ

14.2.1.2. Reacţia de aglutinare pe lamă

Este o reacţie care permite decelarea calitativă a anticorpilor dintr-un ser, dar nu şi aprecieri cantitative.

Materiale necesare:

- lame de microscop;
- antigenul (diluat în soluţie clorurò-sodică);
- serul de cercetat;
- serul normal provenit de la aceeaşi specie animală de la care provine şi serul examinat.

Reacţia se poate efectua punând pe lamă 3 picături după următoarea schemă (Fig. 46).

În cazul prezenţei anticorpilor specifici în serul de cercetat, se produce aglutinarea (2) corpilor bacterieni şi reacţia este considerată pozitivă.

În cazul absenţei anticorpilor din ser, suspensia îşi păstrează omogenitatea şi reacţia este negativă.

Dacă serul normal (4) al unei specii animale conţine aglutinine nespecifice faţă de antigenul folosit în reacţie, se trage concluzia că acest ser nu se pretează pentru diagnosticul serologic.

Picătura de soluţie cloruro-sodică (3) la care s-a adăugat şi o picătură de antigen serveşte drept martor (M) pentru bacteriile care aglutinează spontan în ser.

Seroaglutinarea pe lamă este o metodă rapidă, orientativă, uşor de executat chiar în absenţa unui laborator utilat.

BCU IASI - MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

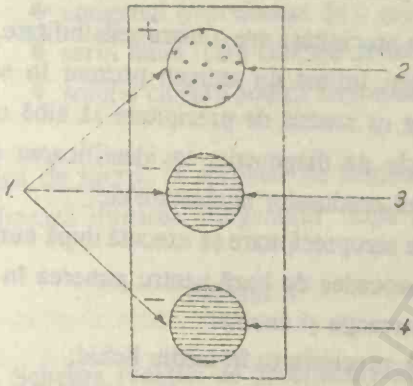


Fig. 46. Schema aglutinării rapide pe lamă:

1 - antigenul (diluat în soluţie cloruro-sodică);
2 - serul de cercetat;
3 - soluţie cloruro-sodică izotonică;
4 - ser normal.

Se foloseşte în cazul când se urmăreşte identificarea unor antigene bacteriene. Rezultatele pozitive ale reacţiei de aglutinare pe lamă trebuiesc confirmate prin reacţia de aglutinare în tuburi.

14.2.2. Reacţia de precipitare (seroprecipitarea)

Precipitarea este rezultatul acţiunii anticorpilor specifici (precipitine) dintr-un ser imun asupra substanţei precipitabile (precipitinogen), în prezenţa electroliţilor.

Antigenul (precipitinogenul) este reprezentat în acest caz de un extract microbian, o toxină, ser provenit de la diferite specii animale, extracte din ţesuturi şi organe etc. (în general, un antigen molecular).

BCU IAŞI - BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

Reacţia de precipitare are o mare sensibilitate. Ea poate pune în evidenţă cantităţi infime de antigen prezent în soluţie. Această proprietate a făcut ca reacţia de precipitare să aibă o largă utilizare practică, ca reacţie de diagnostic, la identificarea apartenenţei de specie, în controlul produselor alimentare etc.

Reacţia de seroprecipitare se execută după numeroase tehnici. Se cunosc două procedee de bază pentru punerea în contact a celor două elemente de reacţie şi anume:

- precipitarea în mediu lichid;
- precipitarea în mediu gelozat (imunodifuzie).

Fiecare dintre aceste procedee are la rândul lui mai multe variante tehnice.

14.2.2.1. Precipitarea în mediu lichid

Această reacţie poate fi executată din punct de vedere calitativ (când se urmăreşte numai evidenţierea cuplului antigen-anticorp) şi cantitativ (când se determină titrul unuia din elemente, de regulă cel al anticorpilor).

Tehnica reacţiei de precipitare în inel

Materiale necesare:

- eprubete de precipitare (eprubete înguste, cu diametrul de 3-4 mm);
- eprubete de hemoliză;
- pipete Pasteur;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- antigenul (reprezentat de o soluţie proteică);
- serul imun (care conţine anticorpii specifici);
- soluţie cloruro-sodică izotonică.

Tehnica de lucru. În eprubete de hemoliză perfect curate şi uscate se realizează diluarea antigenului* după următoarea schemă (Tabelul 5):

Tabelul 5

Schema reacţiei de precipitare în inel

Componentele de reacţie	Numărul eprubetelor								
	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Soluţie cluoro-sodică 8,5‰ (ml)	-	1	1	1	1	1	1	1	1
Antigen (ser de om) diluat 1/10 (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Diluţiile finale de ser	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	-

După efectuarea diluţiilor se pipetează în tuburile înguste de precipitare cca 0,2 - 0,5 ml din fiecare diluţie de antigen realizată, începându-se cu diluţia cea mai mare spre cea mai mică. Apoi, cu ajutorul unei pipete Pasteur se lasă să curgă foarte încet pe peretele

* Spre deosebire de reacţia de aglutinare, în reacţia de precipitare se diluează antigenul în serie şi nu serul imun (anticorpii). Din acest motiv, în mod obişnuit se determină nu diluţia limită a serului imun, ci diluţia limită a antigenului care mai dă încă o reacţie cu serul imun nediluat.

tubului serul imun (antiserul) în acelaşi volum ca antigenul, fără ca cele două componente ale reacţiei să se amestece. Tuburile se incubează la termostat, la 37°C, timp de 30-60 minute.

După scoaterea de la termostat, se citeşte reacţia urmărindu-se apariţia la interfaţa celor două lichide a unui inel alb de precipitare. Reacţia este pozitivă dacă se formează inelul de precipitare. Absenţa inelului respectiv indică o reacţie negativă ca şi în tubul martor.

Se consideră ca titru al serului, ultima diluţie la care mai apare un inel alb cu contur net şi care prezintă stabilitate la o uşoară agitare.

Reacţia de precipitare în inel se foloseşte cu precădere pentru identificarea unor antigene microbiene, umorale sau tisulare, folosind seruri de referinţă corespunzătoare.

14.2.2.2. Reacţia de precipitare în gel (imunodifuzia)

Capacitatea anticorpiior de a precipita specific antigenul corespunzător, poate fi pusă în evidenţă nu numai prin amestecarea lor directă ci şi prin difuzia lor într-un mediu gelificat.

Metodele de imunodifuzie se pot clasifica pe baza numărului elementelor care difuzează, în:

- **metode de difuzie simplă** (când anticorpul este încorporat în mediu gelificat iar antigenul este lăsat să difuzeze în acest mediu);
- **metode de difuziune dublă** (când atât anticorpul cât şi antigenul se introduc în două regiuni diferite ale gelului şi difuzează unul spre celălalt).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica (metoda) difuziunii duble, introdusă de OUCHTERLONY şi ELEK, este cel mai frecvent folosită.

Materiale necesare:

- gel de agar;
- antigenul;
- serul imun (anticorpii);
- lame de sticlă de diferite dimensiuni.

Geloza pentru imunodifuzie se prepară astfel: 12 g agar Noble (Difco) se amestecă cu 600 ml apă distilată şi se lasă la temperatura camerei până a doua zi pentru umflarea agarului. A doua zi se mai adaugă 600 ml tampon-veronal pH = 8,6. Se fierbe amestecul la baia de apă (pentru topirea agarului) aproximativ 10-15 minute. Se repartizează în eprubete sau flacoane închise cu dopuri de vată.

Tampon veronal:

veronal sodic	10,3 g
veronal acid	1,84 g
mertiolat de sodiu (conservant)	0,1 g
apă distilată	1.000 ml

Tehnica de lucru. Pe lame de sticlă curate şi aşezate pe o suprafaţă perfect plană se toarnă geloza topită în aşa fel ca stratul de gel să fie, după solidificare, de aproximativ 0,5 cm. Se practică apoi în masa gelului mai multe godeuri în funcţie de numărul probelor folosite în reacţie. Aranjarea acestora poate fi variată. De regulă serul imun care conţine anticorpi se amplasează în godeul central, iar în godeurile periferice mai mulţi antigeni (sau acelaşi antigen în diferite

diluţii). Amplasarea poate fi şi inversă dacă se urmăreşte reacţia unui antigen cu mai multe seruri.

Plăcile astfel preparate se aşază în cristalizoare cu capac, în care se va menţine o atmosferă umedă prin punerea unui tampon de vată umed. Se introduc apoi în termostat la 37°C sau se lasă la temperatura camerei timp de câteva zile.

Atât antigenul cât şi anticorpii vor difuza în masa gelului şi în zona de întâlnire a celor doi reactanţi vor apare linii evidente de precipitare. Se notează liniile de precipitare care corespund unor fracţiuni antigenice cu viteză şi coeficient de difuzie diferite.

Pentru citirea rezultatelor lamele sau plăcile de sticlă se pot colora prin diferite metode, pentru o mai bună evidenţiere a liniilor de precipitare.

14.2.2.3. Aplicaţii ale reacţiei de precipitare

Utilizarea reacţiei de precipitare ca metodă de diagnostic în bolile infecţioase. În bacteriologie, reacţia de precipitare ca metodă de diagnostic, se utilizează în două scopuri:

- pentru a cerceta puterea precipitantă a serului imun uman sau animal faţă de filtratele unor culturi microbiene corespunzătoare. În acest caz, o reacţie pozitivă demonstrează prezenţa în serul imun a anticorpilor specifici (precipitinele);
- pentru punerea în evidenţă a precipitinogenului din diferite extracte de organe, atunci când nu putem izola agentul cauzal al bolii.

Utilizarea reacţiei de precipitare în medicina legală (reacţia UHLENHUT). Cu ajutorul acestei reacţii se poate preciza cu certitudine dacă o pată de sânge proaspătă sau veche (uscată) găsită pe o haină etc., este de origine umană sau animală.

Pentru efectuarea reacţiei se vor utiliza mai multe seruri precipitante: anti-om, anti-cal, anti-bou, anti-oaie etc.

Se diluează pata de sânge suspectă de pe fragmentul de stofă sau ţesătură în câţiva ml de ser fiziologic. Se filtrează, iar lichidul clar obţinut ce serveşte ca antigen este pus în contact, în tuburi de precipitare cu diluţii din diferite seruri precipitante. Tuburile se ţin 30 minute la 37°C şi apoi se citesc rezultatele. Dacă se produce precipitarea în tuburile în care s-a pus ser precipitant anti-om, în diluţii mari, reacţia este considerată pozitivă, pata de sânge fiind de origine umană. În cazul în care nu s-a produs precipitarea la nici unul din serurile utilizate, se trage concluzia că pata de sânge are o altă proveniență. Pentru a se afla originea, se vor utiliza alte seruri precipitante.

Utilizarea reacţiei de precipitare în controlul alimentelor. Reacţia poate fi utilizată pentru diferenţierea originii cărnii date în comerţ. Se poate deosebi astfel carnea de oaie de carnea de porc, cal etc., indiferent dacă produsul este proaspăt sau conservat.

În acest scop, se va pune în contact un extract apos de carne cu diferite seruri precipitante (anti-porc, anti-cal, anti-oaie, anti-bou etc.). Se poate preciza în cazul unei reacţii pozitive cu unul din aceste seruri, ce origine are carnea sau dacă este vorba de un amestec de diferite cărnuri.

BCU IASI

14.2.3. Reacţia de hemoliză

Hemoliza imună este fenomenul de lizare a hematiilor de către un ser imun hemolitic corespunzător care conţine anticorpi specifici (hemolizine).

Hemolizinele apar în serul animalelor inoculate cu hematii provenite de la alte specii animale şi au proprietatea de a liza aceste hematii în prezenţa alexinei.

Titrarea activităţii unui ser hemolitic

Elementele necesare reacţiei:

- serul imun hemolitic (de exemplu serul imun anti-oaie);
- antigenul (hematii de oaie);
- alexina (complementul);
- soluţie cloruro-sodică izotonică 8,5 g‰;
- eprubete de hemoliză;
- pipete;
- baloane cotate.

Pregătirea elementelor de reacţie:

Serul hemolitic anti-oaie se obţine prin imunizarea iepurelui cu o suspensie de hematii de oaie, spălate prin centrifugare cu o soluţie cloruro-sodică şi readuse la volumul iniţial. Se practică una sau două inoculări la un interval de 3 zile. Sângele se recoltează din vena marginală a urechii, iar după coagulare serul se separă prin centrifu-

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

gare.

Antigenul (hematiile de oaie) se obţine din recoltarea în mod steril a sângelui de oaie din vena jugulară, într-un balon cu perle de sticlă pentru defibrinare. Hematiile astfel obţinute sunt spălate prin centrifugare în soluţie cloruro-sodică de mai multe ori, până ce lichidul supernatant este perfect limpede. După îndepărtarea supernatantului, din depozitul de hematii spălate se face o suspensie de 1,5% în soluţie cloruro-sodică.

Alexina (complementul), se foloseşte în reacţie diluată 1/10. Se foloseşte fie alexină conservată, fie ser proaspăt de cobai, care conţine alexină.

Tehnica de lucru. Din serul hemolitic titrat se fac diluţii succesive (diluţia 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 etc.). Se repartizează din fiecare diluţie câte 1 ml în tuburi de hemoliză. Se adaugă apoi câte 1 ml suspensie 1,5% de hematii de oaie.

Amestecul de ser de cercetat şi suspensia de hematii se incubează la 37°C, timp de o oră. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte 0,5 ml alexină diluată 1/10 şi se agită bine. Volumul final al amestecului este de 2,5 ml. Reacţia se citeşte după o nouă incubare de 30 minute la 37°C.

Ultimul tub din serie este tubul martor (M) care nu conţine ser de cercetat. Acesta conţine 1 ml soluţie cloruro-sodică, 1 ml suspensie de hematii şi 0,5 ml alexină (Tabelul 6).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6

Schema titrării serului hemolitic

Comp. de reacţie	Numărul tuburilor								
	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Ser imun hemolitic (ml)	1 dil. 1/100	1 dil. 1/200	1 dil. 1/400	1 dil. 1/800	1 dil. 1/1600	1 dil. 1/3200	1 dil. 1/6400	1 dil. 1/12800	1 ml sol. cloruro-sodică
Hematii de oaie 1,5% (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Alexină diluată 1/10 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În eprubetele în care a avut loc hemoliza lichidul se înroşeşte şi soluţia devine limpede. Pe fundul eprubetelor se depune stroma hematiilor lizate.

Titrul serului hemolitic este reprezentat de cantitatea de ser care, în volumul total de 2,5 ml şi în prezenţa a 0,5 ml de alexină diluată 1/10, a produs în timp de 30 minute liza totală a 1 ml globule roşii suspensie 1,5% (se va considera întotdeauna tubul cu hemoliza totală).

Reacţia de hemoliză are o largă aplicabilitate practică. Sub numele de *"reacţia de fixare a complementului"* (R.F.C.) se utilizează în diagnosticul diferitelor infecţii: sifilis (reacţie cunoscută sub numele de reacţia BORDET-WASSERMANN), febră tifoidă, gonococii cronice, leptospiroze, infecţii virotice şi rickettsiene.

15. DETERMINAREA SENSIBILITĂŢII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE

Sensibilitatea bacteriilor faţă de antibiotice se testează "in vitro" punându-le în condiţii optime şi standardizate de cultivare (mediu de cultură, inocul, timp de incubare etc.) în prezenţa unor cantităţi descrescânde de antibiotic.

După modalităţile tehnice de realizare se deosebesc două metode de testare a acestei sensibilităţi:

- metoda difuzimetrică;
- metoda diluţiilor seriate.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15.1. METODA DIFUZIMETRICĂ

Metoda difuzimetrică se execută pe medii solide şi are la bază proprietatea antibioticelor de a difuza în mediul de cultură pe o anumită distanţă, realizând un gradient de concentraţie care scade proporţional cu distanţa. Dezvoltarea bacteriei este inhibată pe aria în care antibioticul depăşeşte sau a atins C.M.I. (**concentraţia minimă inhibitorie**), adică cea mai mică cantitate de antibiotic care inhibă dezvoltarea bacteriei testate.

Metoda difuzimetrică standard recomandată de O.M.S. (Organizaţia Mondială a Sănătăţii) pentru laboratoarele clinice, utilizează discuri de hârtie de filtru sau microcomprimate impregnate cu antibiotic. Concentraţiile de antibiotic din aceste microcomprimate sunt astfel calculate încât să corespundă concentraţiilor pe care antibioticele respective le pot atinge în sângele bolnavului.

Metoda difuzimetrică este simplă, rapidă, economică şi uşor de executat. Este metoda practicii de rutină. Ea dă însă informaţii numai în ceea ce priveşte ordinul de mărime al C.M.I. şi nu poate fi aplicată pentru bacteriile cu creştere lentă (*Mycobacterium tuberculosis*).

Materiale necesare:

- plăci Petri sterile, cu diametrul de 12 cm;
- pipete sterile gradate, de 1 şi 5 ml;
- mediu de cultură (geloza nutritivă, geloza-ser, alte medii speciale, dar de preferinţă mediul Müller-Hinton);
- cultura bacteriană (în bulion) de 18 ore;

BCU IASI CENTRAL LIBRARY

- microcomprimate cu antibiotic furnizate de Institutul pentru controlul de stat al medicamentelor.

Tehnica de lucru:

Se toarnă cca 20-25 ml de mediu topit şi răcit la 45-50°C, într-o cutie Petri cu fundul plan şi aşezată pe o suprafaţă perfect orizontală. După solidificarea mediului se însămânţează suprafaţa prin scăldarea cu 3-5 ml dintr-o suspensie din cultura în bulion de 18 ore a bacteriei cercetate. Se uniformizează inoculul prin înclinarea cutiei în diferite direcţii, se absoarbe cu grijă tot excesul şi se lasă să se usuce bine suprafaţa mediului timp de 30 minute.

Suspensia de germeni va fi astfel potrivită încât să permită creşterea unor colonii foarte dese, dar nu confluente. Se utilizează de obicei cultura în bulion ca atare pentru streptococ şi hemofili, sau diluată 1/100 pentru enterococ, 1/200 pentru stafilococ şi 1/1.000 pentru enterobacteriaceae, *Klebsiella, Pseudomonas*.

Pe mediul uscat se plasează microcomprimatele, la 15 mm de marginea cutiei şi la 30 mm distanţă între ele.

După 18-24 ore de incubare la 37°C, se măsoară diametrul zonelor de inhibiţie (Fig. 47).

După M.G. BALŞ (1972), sensibilitatea unei tulpini se stabileşte în raport cu raza zonei de inhibiţie (distanţa între marginea microcomprimatului şi marginea zonei de inhibiţie). Interpretarea se face astfel:

- germene sensibil (raza zonei de inhibiţire peste 6 mm);
- germene puţin sensibil (raza zonei de inhibiţie 2-5 mm);

♦ germene rezistent (raza zonei de inhibiţie 1 mm, sau zonă de inhibiţie absentă).

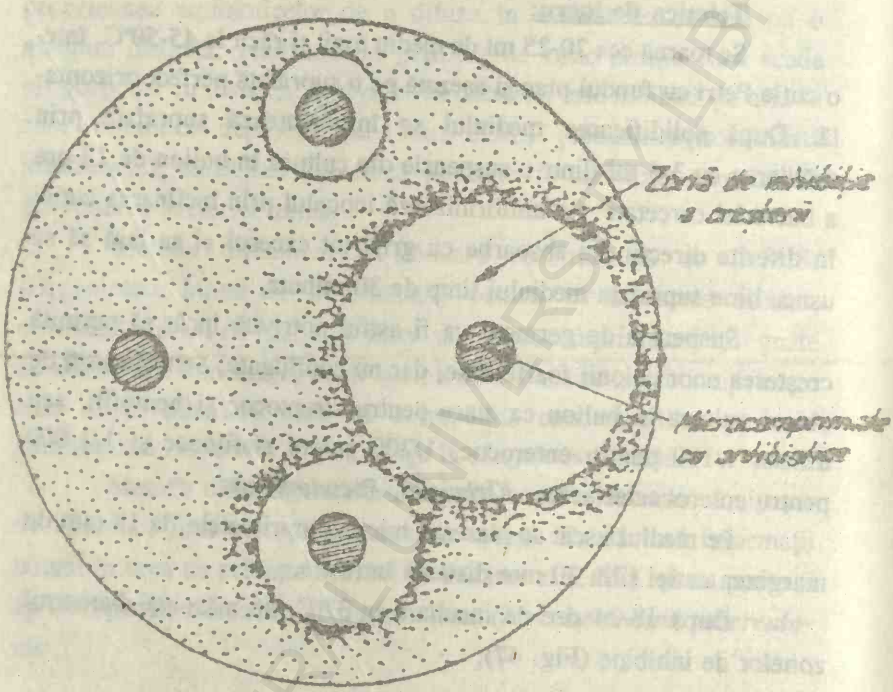


Fig. 47. Citirea rezultatelor unei antibiograme.

Datele obţinute se raportează la curbele sau tabelele de concordanţă, pentru a se putea aprecia concentraţiile minime inhibitorii (μg/ml) de antibiotic faţă de bacteria cercetată.

BCU IASI FETU UNIVERSITY LIBRARY

15.2. METODA DILUŢIILOR SERIATE (DETERMINAREA C.M.I.)

Materiale necesare:

- ♦ eprubete sterile;
- ♦ pipete gradate sterile;
- ♦ mediu de cultură (bulion simplu, mediu Müller-Hinton lichid);
- ♦ cultura în bulion de 18-20 ore a tulpinii de cercetat.

Tehnica de lucru: Se repartizează în eprubete sterile mediul de cultură în care se efectuează diluţii succesive de antibiotic, în aşa fel încât să se obţina în fiecare tub o concentraţie precisă de antibiotic/ml.

Diluţiile trebuie să meargă de la-cea mai mare concentraţie a antibioticului posibilă de obţinut în sânge, până la o concentraţie inferioară C.M.I. a tulpinii martor.

Exemplu: penicilina se diluează, de obicei, în aşa fel încât să se obţină următoarele concentraţii de antibiotic/ml: 100 U.I.; 10 U.I.; 1 U.I.; 0,1 U.I.; 0,01 U.I.; 0,001 U.I..

Streptomicina şi aureomicina se diluează astfel, ca să existe la 1 ml mediu de cultură următoarele cantităţi: 100 μg; 10 μg; 1 μg; 0,1 μg; 0,01 μg şi 0,001 μg.

În fiecare eprubetă, ca şi în tubul martor (fără antibiotic) se însămânţează o cantitate constantă din cultura în bulion de 18 ore a tulpinii cercetate (în mod curent se pune în fiecare tub 1 sau 2 picături dintr-o diluţie efectuată din cultura în bulion).

BCU IASI - BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

Se incubează tuburile la 37°C, timp de 20-24 ore.

Interpretarea rezultatelor: se face în raport cu dezvoltarea sau nedezvoltarea germenilor în mediu. Tubul martor trebuie să conţină o cultură corespunzătoare tipului cultural al speciei.

În primele tuburi din serie, în care cantitatea de antibiotic este mare, mediul, în cazul când bacteria este sensibilă, rămâne nemodificat. În tuburile următoare, cultura este slab dezvoltată, iar în ultimele tuburi cultura va fi tot aşa de bogată şi cu acelaşi aspect ca şi în tubul martor.

C.M.I. a antibioticului pentru tulpina testată este dată de concentraţia de antibiotic din ultimul tub fără creştere evidentă a culturii (Fig. 48).

Metoda diluţiilor în mediul lichid dă informaţii precise privind C.M.I. a antibioticului. Este însă laborioasă şi costisitoare.

Indiferent de metoda folosită, în testarea sensibilităţii la antibiotice a unei tulpini bacteriene se folosesc tulpini martor din colecţie, care şi-au păstrat nealterat spectrul natural de sensibilitate la antibiotice.

Exemplu:

- tulpina Oxford de *Staphylococcus aureus* NCTC-6571 în cazul testării bacteriilor Gram-pozitive;
- *Escherichia coli* NCTC - 10.418 în cazul testării bacililor Gram-negativi.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

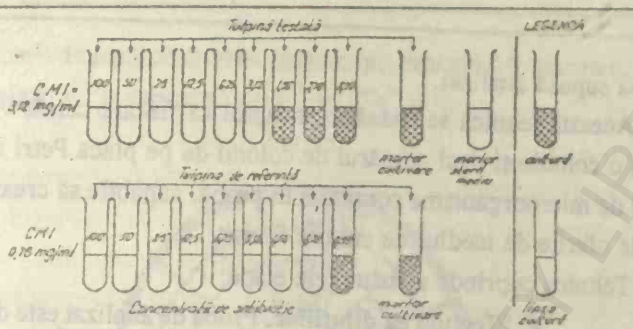


Fig. 48. Determinarea C.M.I. de antibiotice prin metoda diluţiilor.

Dacă se efectuează numărătoarea germenilor viabili din tuburile fără cultivare evidentă, se poate determina concentraţia minimă bactericidă (C.M.B.) definită ca cea mai mică concentraţie de antibiotic care distruge în proporţie de 99,9 - 100% bacteria din inoculul iniţial.

16. DETERMINAREA NUMĂRULUI DE MICROORGANISME DIN DIFERITE MEDII NATURALE

Solul, apa, alimentele ş.a. sunt populate de o variată floră microbiană. Analiza microbiologică a unor astfel de surse implică o gamă largă de medii de cultură adecvate fiecărui tip de microorganism.

Una din metodele de rutină folosite pentru determinarea numărului de microorganisme din diferite surse, este metoda culturilor în plăci. Această metodă foloseşte numărarea coloniilor dezvoltate în urma însămânţării pe medii agarizate în plăci Petri a diluţiilor obţinute

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

din proba supusă analizei.

Această tehnică se bazează pe faptul că fiecare celulă viabilă dezvoltă o colonie şi deci numărul de colonii de pe placa Petri indică numărul de microorganisme conţinute în probă, capabile să crească în condiţiile oferite de mediul de cultură folosit.

Tehnica cuprinde următoarele etape:

a) Efectuarea diluţiilor. Proba de analizat este diluată în scopul obţinerii pe o placă Petri a unui număr de 50-300 colonii. În acest scop se realizează serii de diluţii zecimale (vezi metoda diluţiilor seriate).

b) Însămânţarea. Din diluţiile efectuate se fac însămânţări în plăci Petri, introducând câte 1 ml din fiecare diluţie într-o placă cu mediu topit şi răcit până la 45°C. Plăcile se rotesc uşor pentru distribuirea uniformă a inoculului în mediu. Pentru fiecare diluţie se recomandă să se însămânţeze 2-3 plăci făcându-se apoi media coloniilor dezvoltate.

c) Incubarea. Plăcile însămânţate se pun la termostat la temperatura adecvată: 37°C pentru bacterii şi 28°C pentru ciuperci şi actinomicete.

d) Numărarea coloniilor. Coloniile de bacterii se numără obişnuit după 24-48 ore, cele de ciuperci după 5-7 zile, iar cele de actinomicete după 7-15 zile de incubare la termostat.

Coloniile se numără cu ochiul liber sau cu ajutorul lupei.

În cazul unui număr mare de colonii dezvoltate, numărătoarea se face cu ajutorul unor plăci prevăzute cu o reţea de pătrate gravată în sticlă. Dintre plăcile mai frecvent utilizate menţionăm plăcile Wolfhugel şi Lafar. Placa Wolfhugel este împărţită în 144 suprafeţe

de 1 cm². Placa Lafar este rotundă şi cuprinde 6 sectoare, fiecare subdivizat în 10 suprafeţe de 1 cm² (Fig. 49).

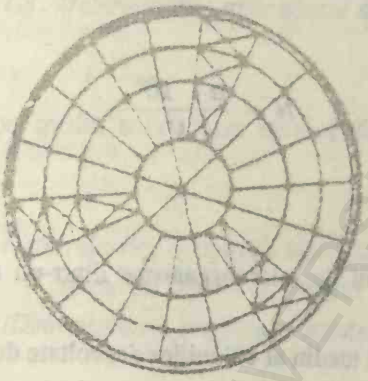


Fig. 49. Placă Lafar pentru numărarea bacteriilor.

Una din aceste plăci se aşază sub cutia Petri şi se numără coloniile din 10-20 suprafeţe de 1 cm². Apoi se face media pentru 1 cm². Pentru aflarea numărului total de colonii din placă se înmulteşte numărul aflat pe cm² cu suprafaţa plăcii.

Pentru operativitate se folosesc aparate speciale de tipul numărătorului de colonii "titriplaque".

Cea mai bună diluţie este cea din care se dezvoltă un număr de 50-100 colonii. Dacă numărul coloniilor crescute în cazul însămânţării unei diluţii este mai mic de 10 sau mai mare de 300 atunci aceste rezultate nu se iau în considerare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul de germeni dintr-un ml de produs inițial examinat se calculează după formula:

$$N = \frac{a \cdot 10^n}{V}$$

în care:

N = numărul de microorganisme dintr-un ml de suspensie inițială;

a = numărul mediu al coloniilor dezvoltate după însămânțare;

10 = coeficient de diluție;

n = numărul de ordine al diluției cu care s-a făcut însămânțarea;

V = volumul în ml de suspensie folosită la însămânțare.

Avantajul acestei metode constă în simplitatea ei și în faptul că nu necesită aparatură complexă. Dezavantajul ei rezultă din faptul că în cazul microorganismelor care formează lanțuri sau alte grupări caracteristice (ciorchine, tetrade etc.), uneori se formează, după însămânțare, numai o singură colonie iar la numărătoare se obține un număr mai mic de microorganisme decât în realitate.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16.1. MICROBIOTA SOLULUI

16.1.1. Determinarea microflorei din sol

Metoda pe mediu solid (vezi tehnica de lucru descrisă la pagina 274).

16.1.2. Determinarea activităţii biologice globale a solului pe baza CO_2 produs (Determinarea respiraţiei solului)

Principiul metodei. În solul din care au fost îndepărtate plantele superioare, producerea CO_2 se datoreşte activităţii vitale a microorganismelor. Adăugarea substanţelor organice stimulează dezvoltarea microorganismelor şi, astfel, devine mai intensă producerea de CO_2 . CO_2 format este absorbit de o soluţie de NaOH de concentraţie cunoscută. Cantitatea de CO_2 absorbit se determină prin titrarea soluţiei de NaOH cu o soluţie de HCl.

Material necesar:

- borcane de 1/2 l;
- pahare Borrel;
- sol proaspăt;
- glucoză;
- celuloză pulvis;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- paie pulverizate;
- NaOH 0,2 N;
- HCl 0,1 N;
- $BaCl_2$, soluţie 20%;
- fenolftaleină, soluţie alcoolică 1%.

Tehnica de lucru:

Se folosesc 5 borcane de 1/2 l, care se pot închide ermetic. Se numerotează de la 1 la 5. În borcanele 2, 3, 4 şi 5 se introduc câte 50 g sol proaspăt, după care se mai adaugă glucoză, celuloză pulvis şi paie pulverizate conform tabelului 7.

Tabelul 7

Schema experienţei pentru determinarea respiraţiei solului

Numărul borcanului	Sol (g)	Glucoză (g)	Celuloză (g)	Paie (g)	NaOH 0,2 N (ml)
1	-	-	-	-	50
2	50	-	-	-	50
3	50	0,1	-	-	50
4	50	-	1	-	50
5	50	-	-	1	50

Substanţele se amestecă cu solul, folosind o spatulă sterilizată prin flambare şi apoi răcită. Dacă solul este uscat se mai adaugă şi apă distilată (circa 25%). Apoi în fiecare borcan se introduce un pahar

Borrel conținând 50 ml NaOH 0,2 N. Borcanele se închid ermetic și se pun la incubat la temperatura camerei sau la 30°C. După 7 zile de incubare conținutul paharelor Borrel se titrează cu HCl 0,1 N. În prealabil în fiecare pahar se introduc 5 ml soluție de $BaCl_2$ 20% și 5 picături de fenolftaleină 1%. Conținutul paharului devine albastru, ceea ce înseamnă că NaOH 0,2 N nu a fost în întregime neutralizat de către CO_2. Dacă lichidul nu devine albastru, aceasta denotă că borcanul nu a fost închis ermetic și s-a fixat CO_2 din aer ori s-au produs cantități de CO_2 foarte mari, peste capacitatea soluției de NaOH folosită pentru fixarea CO_2. După adăugarea fenolftaleinei (care servește ca indicator), lichidul din pahar se titrează cu HCl 0,1 N până la dispariția colorației albastre (lichidul devine alb).

Cei 50 ml NaOH 0,2 N necesită teoretic 100 ml HCl 0,1 N. Însă, consumul de HCl 0,1 N va fi mai mic, deoarece NaOH a fixat CO_2 din aerul din borcan. Se notează numărul de ml de HCl 0,1 N folosiți.

Rezultatele se calculează pe baza cifrelor obținute la titrarea cu HCl 0,1 N. Dacă Q_1 reprezintă numărul de ml de HCl 0,1 N folosiți pentru titrarea NaOH 0,2 N din paharul de la borcanul fără sol și Q_2 - numărul de ml de HCl 0,1 N folosiți pentru titrarea NaOH 0,2 N din paharele de la borcanele cu sol, atunci producerea de CO_2 (P) se poate calcula cu ajutorul formulei:

$$P = (Q_1 - Q_2) \cdot f \cdot 2{,}2 \ mg\ CO_2$$

BCU IASI/CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

unde:

f = factorul soluției de HCl 0,1 N;

2,2 = 1 ml HCl 0,1 N este echivalent cu 2,2 mg CO_2.

Rezultatele obținute vor fi trecute în tabelul 8.

Tabelul 8

Cantitatea de CO_2 degajată în probele de sol analizate

Numărul borcanului	Varianta	HCl 0,1 N folosit pentru titrarea soluției de NaOH	P mg CO_2
1	fără sol		
2	numai sol		
3	sol + glucoză		
4	celuloză		
5	sol + paie		

16.1.3. Evidențierea efectului de rizosferă

Principiul metodei. Rizosfera desemnează zona de sol din jurul rădăcinilor. În această zonă se găsește un număr mai mare de

microorganisme, acestea fiind cu mult mai numeroase decât în restul solului. Bacteriile sunt afectate mai mult decât alte grupe de microorganisme. Există efecte de rizosferă calitative şi cantitative produse la diferite plante şi chiar la aceeaşi plantă în diferite perioade de vegetaţie. Localizarea microorganismelor în rizosferă se datorează în primul rând exudaţiei substanţelor organice de către rădăcinile plantelor, dar rădăcinile pot, de asemenea, modifica compoziţia atmosferei, concentraţia nutrienţilor minerali şi umiditatea solului înconjurător. Desigur, activitatea microbiană vastă în zona rădăcinii influenţează planta. Unii produşi microbieni stimulează, iar alţii inhibă creşterea plantei, populaţia rizosferică putând afecta respiraţia rădăcinii şi absorbţia ionilor.

Materiale şi medii de cultură.

- Probe de sol: rădăcini cu sol rizosferic ataşat; sol din acelaşi teren (câmp) dar fără rădăcini, colectat de la suprafaţă şi sol din acelaşi teren colectat de la adâncimea de circa 35 cm.

- Extract de sol agarizat, compus din:

extract de drojdii	1	g
K_2HPO_4	0,4	g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,5	g

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$MgSO_4.7\ H_2O$	0,05 g
$FeCl_2$	0,01 g
$CaCl_2$	0,1 g
extract de sol	250 ml
agar-agar	15 g
apă de robinet	750 ml

pH = 7,4

Se fierbe 30 minute şi apoi se filtrează. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C, timp de 20 minute.

- Baloane cu 9 şi 99 ml apă de robinet sterilă;
- Baloane conţinând 95 ml apă de robinet sterilă şi perle de sticlă sterilizate;
- Pipete gradate de 1 ml sterile;
- Cutii Petri sterile.

Tehnica de lucru. Rădăcinile plantei sunt scuturate cu grijă pentru a îndepărta particulele de sol slab aderente. O cantitate din rădăcinile cu sol rizosferic ataşat se introduce într-un balon ce conţine 95 ml apă de robinet sterilă şi o cantitate mică de perle de sticlă. Amestecul se agită puternic timp de 15 minute. Din suspensia obţinută se prepară apoi diluţiile de 10^{-6} şi 10^{-7}, utilizând pentru diluare apă de robinet sterilă. Din solul nerizosferc se prepară diluţiile 10^{-5} şi 10^{-6}, iar din solul de la adâncimea de 35 cm se prepară diluţiile de 10^{-4} şi 10^{-5}. Din fiecare diluţie se inoculează 5 cutii Petri. Volumul inoculului

este de 1 ml. Apoi în cutiile Petri inoculate se toarnă mediul cu extract de sol agarizat, lichefiat şi răcit la 45-48°C. După solidificarea mediului, cutiile Petri se pun la incubat la 28°C timp de 7 zile. După incubare, se determină numărul de colonii, stabilind apoi numărul de bacteri pe g de sol rizosferic, respectiv pe g de sol nerizosferic.

În continuare, pentru a stabili dacă există diferenţe semnificative între solul rizosferic şi cel nerizosferic, în ceea ce priveşte tipul morfologic de bacterii este necesar să caracterizăm formele care predomină. Din cutiile Petri mai reprezentative, de la fiecare sol, se aleg 100 colonii din care se izolează bacteriile şi se efectuează din fiecare cultură frotiuri care se colorează după metoda Gram. Pe baza examenului microscopic se încadrează în următoarele categorii stabilite de TAYLOR şi LOCHHEAD în anul 1938:

Grupul I: bastonaşe scurte, Gram-pozitive;
Grupul II: bastonaşe scurte, Gram-negative;
Grupul III: bastonaşe scurte, Gram-variabile;
Grupul IV: bastonaşe scurte, evoluând spre coci;
Grupul V: bastonaşe cocoide, Gram-pozitive;
Grupul VI: coci, Gram-pozitivi sau Gram-negativi;
Grupul VII: bastonaşe lungi, nesporulate;
Grupul VIII: bastonaşe sporulate.

Tot din culturile pure obţinute se efectuează şi o serie de teste biochimice (reducerea nitraţilor, reducerea albastrului de metilen, producerea de indol, producerea de H_2S, producerea de acetoină, hidroliza gelatinei, a amidonului şi a ureei) pentru a putea încadra bacteriile din sol în grupe fiziologice, iar pentru încadrarea lor în grupe nutriţionale se ia în considerare capacitatea fiecărei culturi pure

de a creşte pe 7 tipuri de medii nutritive. Compoziţia acestora este redată mai jos.

1. Mediul bazal: glucoză 1 g, K_2HPO_4 1 g, KNO_3 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,2 g, $CaCl_2$ 0,1 g, NaCl 0,1 g, $FeCl_2$ 0,01 g, apă distilată 1.000 ml. Amestecul se fierbe, se filtrează şi se corectează pH-ul la 6,8. În final se sterilizează la 105°C, 20 minute.

2. Mediul cu aminoacizi: mediu bazal + cazaminoacizi în proporţie de 0,4%.

3. Mediul cu factori de creştere: 1.000 ml mediu bazal + cisteină 0,05 g, tiamină 100 μg, biotină 0,1 μg, piridoxină 200 μg, acid pantotenic 100 μg, acid nicotinic 100 μg, riboflavină 200 μg, inozitol 0,5 g, vitamina B_{12} 2 μg.

4. Mediul cu aminoacizi + factori de creştere: se amestecă în proporţii egale mediul 2 cu mediul 3.

5. Mediul cu extract de drojdii: mediu bazal + extract de drojdii în proporţie de 0,1%.

6. Mediul cu extract de sol: 750 ml mediu bazal + 250 ml extract de sol.

7. Mediul cu extract de drojdii + extract de sol: la amestecul cu extract de sol se adaugă extract de drojdii în proporţie de 0,1%.

Culturile pe mediul lichid se incubează timp de 5 zile la 28°C, iar intensitatea creşterii se determină turbidimetric.

Pe baza rezultatelor obţinute bacteriile din sol se grupează din punct de vedere nutriţional, după cum urmează:

1. bacterii cu necesităţi nutritive simple;
2. bacterii necesitând unul sau mai mulţi aminoacizi;
3. bacterii care necesită factori de creştere;

BCU IASI

4. bacterii care necesită aminoacizi şi factori de creştere;
5. bacterii care necesită substanţe neidentificate din extractul de drojdii;
6. bacterii care necesită substanţe neidentificate din extractul de sol;
7. bacterii care necesită substanţe neidentificate atât din extractul de sol cât şi din extractul de drojdii.

16.1.4. Determinarea activităţii enzimatice a solului

16.1.4.1. Determinarea activităţii catalazice

Principiul metodei. La probe de sol active şi inactivate termic se adaugă o soluţie tampon şi soluţie apoasă a substratului (H_2O_2). După incubare, se determină cantitativ apa oxigenată nedescompusă. Catalaza şi catalizatorii neenzimatici termostabili (oxizii de fier şi de mangan, substanţele humice, mineralele argiloase) acţionează conform reacţiei:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow[catalizatori\ neenzimatici]{catalaza\ si} 2\ H_2O_2 + O_2$$

Material necesar:

- soluţie tampon fosfat (pH = 6,8). Se dizolvă 4,539 g de KH_2PO_4 şi 5,938 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ (sau 11,946 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$) în apă distilată fiartă şi răcită şi se completează la 500 ml;
- soluţie de H_2O_2 3% (greut./vol.). Se prepară în

momentul folosirii din apă oxigenată concentrată (perhidrol aprox. 30%). Pentru a determina concentrația perhidrolului comercial se iau din acesta 0,5 ml, se introduc într-un balon cotat de 100 ml și se completează cu apă distilată până la semn. Din această soluție se iau în 3-4 baloane Erlenmeyer de 100 ml câte 10 ml, la care se adaugă 10 ml H_2SO_4 4 N. Soluția obținută se titrează cu $KMnO_4$ 0,05 N. 1 ml de permanganat 0,05 N corespunde la 0,85 mg H_2O_2. Se calculează valoarea medie a consumului de permanganat la cele 3-4 titrări. Cu această cifră se poate calcula concentrația (greut./vol.) perhidrolului comercial.

- soluție de H_2SO_4 4 N;
- soluție de $KMnO_4$ 0,05 N.

Tehnica de lucru:

La 3 g sol activ sau inactivat termic se adaugă 10 ml soluție tampon și 2 ml soluție de H_2O_2 3%. Amestecul se agită și după 60 minute de incubare la temperatura camerei, se oprește reacția prin adăugarea a 10 ml soluție de H_2SO_4 4 N. Apoi se adaugă 78 ml apă distilată și se filtrează prin hârtie de filtru. Din filtratul clar se iau 25 ml și se introduc într-un balon Erlenmeyer de 100 ml. Se adaugă 2,5 ml H_2SO_4 4 N și se titrează cu soluția de permanganat până la obținerea unei colorații slab roz.

Drept martor se folosesc: a) probe cu sol, dar fără substrat; b) probe fără sol, dar cu substrat.

Inactivarea probelor de sol se efectuează în felul următor: solul se umectează cu apă distilată în așa fel încât să fie acoperit cu un strat apos de 1-2 mm; se autoclavează la 121°C timp de o oră/zi, în

3 zile consecutiv; în intervalele de 24 ore, probele se ţin la temperatura camerei, iar după a 3-a autoclavare probele se usucă la 110°C.

Exprimarea activităţii catalazice. Diferenţa între consumul de permanganat la proba martor cu substrat fără sol şi probele active cu sol şi substrat reprezintă activitatea catalitică totală (enzimatică+neenzimatică). Diferenţa între consumul de permanganat la proba martor cu substrat fără sol şi probele inactivate termic cu adaos de H_2O_2 reprezintă activitatea catalitică neenzimatică. Diferenţa între activitatea catalitică totală şi activitatea catalitică neenzimatică este egală cu activitatea enzimatică (catalazică). Activităţile pot fi exprimate în mg apă oxigenată/g sol, ştiind că 1 ml de permanganat 0,05 N corespunde la 0,85 mg H_2O_2. Activităţile pot fi exprimate şi în procente de descompunere a H_2O_2.

16.1.4.2. Determinarea activităţii dehidrogenazice a solului

Principiul metodei. Se adaugă în proba de sol $CaCO_3$ (pentru neutralizarea acizilor care se formează în cursul incubării) şi soluţie de TTC (clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu) care serveşte ca acceptor al hidrogenului transferat de dehidrogenaze. Drept donatori de H servesc substanţele organice preexistente în sol sau/şi glucoza adăugată. Nu se adaugă toluen sau un alt antiseptic, deoarece activitatea dehidrogenazică se datorează microflorei vii, capabile de proliferare. Substanţele antiseptice inhibă activitatea dehidrogenazică. În cursul incubării, TTC-ul - care este un compus incolor - se reduce sub acţiunea H transferat de dehidrogenaze, la un compus roşu

(formazan).

Formazanul se extrage cu solvenţi organici (etanol, metanol, acetonă) şi se determină fotocolorimetric. Cu cât este mai mare concentraţia formazanului, cu atât este mai ridicată activitatea dehidrogenazică.

Material necesar:

- $CaCO_3$ siccum, fin pulverizat;
- soluţie de TTC 3% (3 g TTC se dizolvă în apă distilată până la 100 ml; se păstrează în sticlă brună);
- soluţie de glucoză 3%;
- etanol sau acetonă;
- soluţie etalon de formazan. Într-un balon cotat de 50 ml se introduc 0,5 ml soluţie TTC 3%. Apoi se adaugă circa 0,5 g Zn pulverizat pentru reducerea TTC la formazan. Balonul se închide cu dopul de sticlă şi se pune la întuneric. După câteva zile (2-5), la acest amestec se adaugă etanol absolut sau acetonă până la semnul balonului, pentru dizolvarea formazanului. Soluţia roşie se decantează. Cei 50 ml de soluţie (volumul ocupat de Zn, fiind foarte mic, se neglijează) corespund la 15 mg TTC, deci conţin 13,44 mg formazan. Soluţia se păstrează în sticlă brună, la întuneric.

Tehnica de lucru:

La 15 g sol recent colectat, apoi uscat la temperatura camerei (sau la un curent de aer rece) şi cernut printr-o sită cu ochiuri de 1-2

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

mm, se adaugă 0,15 g $CaCO_3$ şi se amestecă bine. Apoi se repartizează în 4 eprubete (3 g/eprubetă).

În cazul determinării activităţii dehidrogenazice actuale, la sol nu se adaugă substanţe organice (glucoză) drept donatori de H. În consecinţă, substanţele organice preexistente în sol vor servi ca donatori de H. În vederea determinării, se va lucra cu 2 eprubete conţinând câte 3 g sol + $CaCO_3$. În eprubeta 1 se introduc 0,5 ml soluţie de TTC şi apă distilată fiartă şi răcită. Cantitatea de apă trebuie să fie suficientă pentru a satura solul şi a forma un strat subţire de lichid pe suprafaţa amestecului de reacţie. Se notează volumul necesar de apă (V ml). De obicei, sunt necesari 1-1,75 ml apă. În eprubeta a doua - care serveşte drept martor cu sol, fără TTC - se adaugă 0,5 ml + V ml apă distilată fiartă şi răcită.

În cazul determinării activităţii dehidrogenazice potenţiale, la sol se adaugă glucoză, care - alături de substanţele organice preexistente în sol - va servi ca donator de H.

În vederea determinării se va lucra cu alte 2 eprubete conţinând câte 3 g sol + $CaCO_3$. În eprubeta 3 se introduc 0,5 ml de soluţie de TTC, 1 ml soluţie de glucoză şi (V-1) ml apă distilată fiartă şi răcită. În eprubeta 4 - care serveşte drept martor cu sol, fără TTC - se adaugă 1 ml soluţie de glucoză şi (V-0,5) ml de apă distilată fiartă şi răcită.

Nu este necesară prepararea probelor martor fără sol cu TTC, respectiv fără sol cu TTC + glucoză, deoarece din aceste probe nu se pot extrage substanţe colorate.

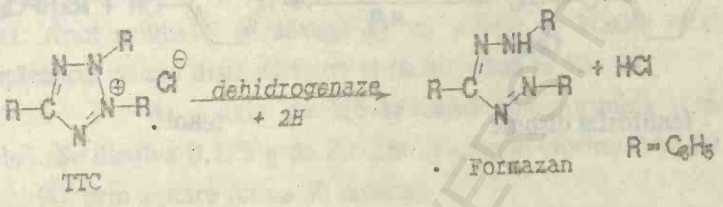
După prepararea amestecurilor de reacţie, toate eprubetele se închid cu dopuri de plută şi se pun la incubat, la 37°C pentru 24 ore.

După incubare, în fiecare eprubetă se adaugă etanol sau acetonă, în doze succesive de 8-10 ml. După fiecare adăugare, conținutul eprubetelor se agită, apoi se lasă ca solul să se depună. În continuare, lichidul se filtrează prin vată în baloane cotate (sau cilindri gradați) de 50 ml. După extragerea substanțelor colorate, pe vată se mai pune etanol sau acetonă până la dispariția totală a coloratiei roșii. Filtratul se completează până la 50 ml cu etanol sau acetonă și după agitare, se determină intensitatea coloratiei (la fotocolorimetru FEK-M se lucrează cu filtrul albastru, iar la spectrofotometru determinarea se face la 485 mμ). Pentru obținerea curbei etalon, din soluția etalon (conținând 13,44 mg formazan/50 ml) se iau 4-10 ml, din care se prepară diluții cu etanol sau acetonă. Gradul diluției este în funcție de intensitatea coloratiei roșii la extractele filtrate ale amestecurilor de reacție.

Exprimarea activității dehidrogenazice. Extincția extractului din eprubeta 1 reflectă cantitatea formazanului și a unor substanțe colorate preexistente în sol. La eprubeta 2, extincția extractului este dată numai de unele substanțe colorate preexistente în sol. Echivalentele în formazan ale extincțiilor se citesc pe curba etalon. Diferența dintre echivalentele în formazan ale extractelor din eprubeta 1 și 2 caracterizează activitatea dehidrogenazică actuală, care se exprimă în mg formazan/10 g sol.

Extincția extractului din eprubeta 3 reflectă cantitatea formazanului produs în prezența glucozei adăugate și cantitatea unor substanțe colorate preexistente și sol și produse în prezența glucozei. La eprubeta 4 extincția extractului este dată numai de unele substanțe

colorate preexistente în sol şi formate în prezenţa glucozei. Echivalentele în formazan ale extincţiilor se citesc pe curba etalon. Diferenţa dintre echivalentele în formazan ale extractelor din eprubetele 3 şi 4 caracterizează activitatea dehidrogenazică potenţială, care se exprimă - ca şi cea actuală - în mg formazan/10 g sol.

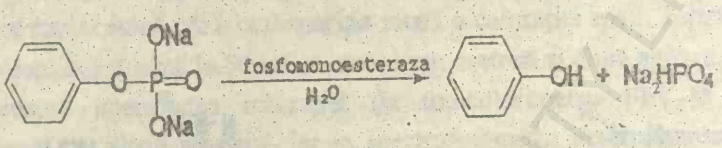


16.1.4.3. Determinarea activităţii fosfatazice

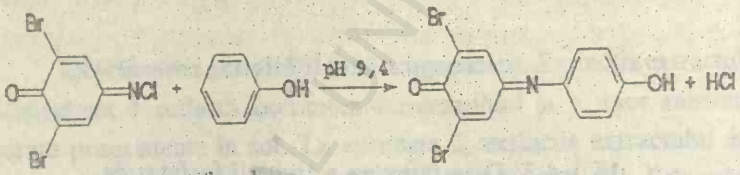
Principiul metodei. Solului i se adaugă toluen (pentru a preveni proliferarea microorganismelor) şi soluţia apoasă a substratului enzimatic (fenilfosfat disodic). În cursul incubării, fenilfosfatul se scindează hidrolitic sub acţiunea fosfomonoesterazei, producându-se fenol şi fosfat disodic.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fenolul reacţionează cu 2,6-dibromchinon-clorimidă (reactiv Gibbs), formându-se un compus albastru (un indofenol) care se determină fotocolorimetric:



fenilfosfat disodic fenol .



fenol indofenol

2,6-dibromchinon-clorimidă

Cu cât este mai mare concentraţia indofenolului, cu atât va fi mai ridicată activitatea fosfatazică.

Material necesar:

- toulen;
- soluţie de fenilfosfat disodic 0,5%. Se dizolvă 0,5

g fenilfosfat disodic în circa 80 ml apă distilată. Se controlează pH-ul soluției. Dacă acesta nu este 7, se ajustează la această valoare, apoi soluția se completează cu apă distilată până la 100 ml;

- soluție de alaun 0,3%;
- soluție tampon borax (pH = 9,4). Se dizolvă 14,2 g borax ($Na_2B_4O_7$. 10 H_2O) în circa 400 ml apă distilată fiartă și răcită. Apoi soluției i se adaugă 41 ml soluție de NaOH N și se completează cu apă distilată fiartă și răcită, până la 500 ml;
- soluție de 2,6-dibromchinon-clorimidă (reactiv Gibbs). Se dizolvă 0,125 g de 2,6-dibromchinon-clorimidă în 50 ml etanol 90° prin agitare (circa 30 minute).

Lichidul se filtrează prin hârtie de filtru, obținându-se o soluție clară. Soluția se păstrează în sticlă brună la frigider și poate fi folosită până când nu se brunifică, adică cât timp rămâne galbenă (circa 12 zile);

- soluție etalon de fenol. Se dizolvă 1 g fenol p.a. în HCl 1 N până la 1.000 ml. Soluția se păstrează în sticlă brună la frigider. În momentul analizei, se iau 5 ml din soluția etalon și se diluează cu apă distilată până la 100 ml.

Această soluție - care se va folosi pentru obținerea curbei etalon - conține 50 μg fenol/mg.

Tehnica de lucru:

Într-un balon cu fund plat de 100 ml se cântăresc 2,5 g sol uscat la temperatura camerei și cernut printr-o sită cu ochiuri de 2 mm. Se adaugă apoi 10 ml soluție de fenilfosfat disodic. Drept martor

servesc: o probă de sol fără fără substrat (cu apă distilată în locul soluţiei de substrat) şi o probă fără sol. Amestecurile de reacţie se agită, baloanele se închid cu dopuri de cauciuc şi se pun la incubat la 37°C, pentru 2 ore. Dacă incubarea trebuie prelungită peste 2 ore, din cauză că activitatea este foarte mică, atunci la proba de sol se adaugă 2 ml toluen şi după agitare şi aşteptare timp de 15 minute, se va adăuga soluţia de substrat.

După incubare, în fiecare balon se adaugă câte 100 ml soluţie de alaun (pentru a coagula coloizii). Amestecurile se agită şi se filtrează prin hârtie de filtru. Din filtratul clar se pipetează 1-5 ml (în funcţie de intensitatea activităţii fosfatazice) într-un balon cotat de 25 ml în care în prealabil s-au introdus 5 ml soluţie tampon borax. După agitare, se adaugă 0,8 ml reactiv Gibbs şi se completează cu apă distilată până la semn (25 ml). Se agită şi după 30 minute de aşteptare, soluţia albastră se fotocolorimetrează. Limitele determinării sunt: 10-120 μg fenol/25 ml soluţie de fotocolorimetrat.

Pentru obţinerea curbei etalon, din soluţia de fenol conţinând 50 μg fenol/ml se iau 0; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,4 ml şi se introduc în baloane cotate de 25 ml, în care în prealabil s-au adăugat 5 ml soluţie tampon borax. După agitare, se adaugă 0,8 ml reactiv Gibbs şi se completează apoi cu apă distilată la semn. Se agită şi după 30 minute de aşteptare, soluţiile se fotocolorimetrează. Aceste soluţii conţin 0; 10; 25; 50; 75; 100; 120 μg fenol/25 ml.

Exprimarea activităţii fosfatazice. De pe curba etalon se citesc cantităţile de fenol din filtratele analizate. Cantitatea de fenol, evidenţiată din probele cu sol şi substrat caracterizează

intensitatea activităţii fosfatazice. Această valoare trebuie modificată cu cantităţile de fenol găsite în probele martor. Activitatea fosfatazică se exprimă în mg fenol/2,5 g sol. Ea poate fi exprimată şi în mg fenol/100 g sol.

16.2. MICROBIOTA APEI

Apele naturale conţin o largă varietate de microorganisme. Analiza unei probe de apă pe un singur mediu de cultură permite evidenţierea numai a unei mici părţi din populaţia microbiană totală. De accea, atât mediile nutritive cât şi procedeele de izolare sunt diferenţiate.

Majoritatea bolilor transmise prin apă au ca agenţi etiologici microorganisme eliminate prin tubul digestiv. De aici, rezultă că prima şi cea mai importantă condiţie bacteriologică de potabilitate a apei este absenţa din apă a enterobacteriilor patogene. Punerea în evidenţă a acestora în apă este destul de dificilă datorită, pe de o parte metodelor mai complicate, iar pe de altă parte, inconstanţei prezenţei lor în apă. Există însă câteva condiţii pe care trebuie să le îndeplinească aceşti indicatori ai poluării fecale a apei şi anume:

- să fie prezenţi constant şi în cantitate mare în materiile fecale ale omului şi animalelor cu sânge cald;
- să fie absenţi sau puţin numeroşi în mediul exterior sau în alte surse;
- să fie uşor de izolat, identificat şi numărat prin examene bacteriologice simple şi rapide;
- să permită stabilirea unei relaţii cantitative între

numărul lor şi nivelul de poluare a apei;

- să fie incapabili să se multiplice în apă;
- să supravieţuiască în apă timp mai îndelungat decât microorganismele patogene şi să reziste un timp cât mai apropiat de cel al patogenilor.

Probele de apă pentru analiză se recoltează şi se transportă cu anumite precauţii. Cantitatea de apă necesară variază de la 500 cm^3, pentru analizele curente, până la 100 dm^3 pentru analizele complementare. Transportul se face în lăzi compartimentate, refrigerate sau cu agenţi frigorifici. În funcţie de distanţă, în special în anotimpul cald, probele se transportă mai uşor, în genţi frigorifice, astfel ca temperatura să nu depăşească +4° C. Dacă probele de apă recoltate nu pot fi aduse în laborator în timp util, datorită unor distanţe prea mari care trebuie parcurse, se păstrează la frigider maximum 24 ore. În cazul în care apa de analizat este clorinată, înainte de sterilizarea buteliei pentru recoltarea probei se introduce în aceasta 1 ml soluţie de tiosulfat de sodiu 0,5% pentru 100 ml probă de apă ce urmează a fi recoltată. Soluţia de tiosulfat va fi sterilizată în prealabil la 100°C, câte 20 minute timp de 3 zile consecutiv.

Buteliile cu probele de apă se prevăd cu etichete pe care se înscriu datele necesare identificării probei:

- numărul probei sau lotului;
- denumirea punctului de recoltare;
- data şi ora recoltării şi eventualele caracteristici ale locului de recoltare.

Analiza bacteriologică a apei are drept scop aprecierea caracterului de potabilitate a apei. Rezultatele acestei analize se

corelează cu cele ale determinărilor organoleptice, fizice, chimice şi biologice, în vederea aprecierii complexe a potabilităţii apei. Pentru analiza bacteriologică a apei se folosesc următoarele metode:

- metode de analiză curentă;
- metode de analiză complementară.

1. Metodele de analiză curentă - sunt obligatorii şi se referă la:

a) determinarea numărului total de germeni care se dezvoltă la 37°C;

b) determinarea numărului probabil de germeni coliformi.

2. Metodele de analiză complementară - se aplică atunci când probele de apă necesită determinări speciale, ca în cazul alegerii de noi surse de apă, când există un număr prea mare de germeni, când apar epidemii hidrice etc., şi se referă la:

a) determinarea numărului total de germeni care se dezvoltă la 22°C;

b) determinarea numărului probabil de germeni coliformi prin metoda membranelor filtrante;

c) determinarea numărului probabil de germeni coliformi fecali;

d) determinarea numărului probabil de streptococi fecali.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

16.2.1. METODELE DE ANALIZĂ CURENTĂ

a) Determinarea numărului total de germeni care se dezvoltă la 37°C

Prin determinarea numărului de germeni care se dezvoltă la 37°C se stabileşte gradul de impurificare bacteriană a apei. Pentru aceasta se foloseşte metoda culturilor în plăci.

Materiale necesare:

- cutii Petri cu diametrul de 10 cm (sterile);
- pipete gradate de 1 ml şi 10 ml cu valoarea diviziunii de 0,01 ml şi respectiv 0,1 ml (sterile);
- eprubete cu dimensiunile 16 x 160 mm (sterile);
- apă de robinet sterilă;
- mediu de cultură - geloză 1,5%;
- lupă citoplast.

Metoda de lucru:

Efectuarea diluţiilor. Proba de apă se agită bine de circa 20 ori. Apoi folosind o pipetă gradată se ia din proba de apă 1 ml şi se introduce într-o eprubetă sterilă, în care în prealabil s-au introdus 9 ml apă de robinet sterilă (diluţia 1/10). Din această diluţie se ia 1 ml şi se introduce în altă eprubetă care conţine 9 ml apă sterilă (diluţie 1/100). În mod analog se obţin diluţiile mai mari în serie zecimală (1/1.000, 1/10.000, etc.).

Însămânţarea. Din proba de apă diluată 1/10, 1/100 etc. se

fac însămânţări introducând din fiecare diluţie câte 1 ml în 2-3 cutii Petri sterile. Dacă proba de analizat este impurificată sau nu se cunoaşte gradul de puritate, se fac însămânţări si cu alte diluţii mai mari. În fiecare cutie Petri se introduc câte 10-15 ml geloză topită şi răcită la circa 45°C. Se omogenizează conţinutul cutiilor Petri prin mişcări de rotaţie în plan orizontal, după care se lasă să se solidifice geloza. Pe capacele cutiilor Petri se notează numărul probei, diluţia, data însămânţării.

Incubarea. Cutiile Petri însămânţate se introduc cu capacul în jos în termostat pentru incubare la 37°C timp de 24 ore. În cazul probelor de apă care au fost clorinate, incubarea durează 48 ore sau mai mult.

Stabilirea numărului total de germeni/ml. Numărul total de germeni este dat de numărul coloniilor crescute pe suprafaţa şi în interiorul gelozei din cutia Petri. Citirea se face la lupă, astfel:

- dacă cutiile Petri conţin mai puţin de 300 colonii, se numără în totalitate;
- dacă cutiile Petri conţin peste 300 colonii, nu se iau în considerare în stabilirea numărului de germeni;
- dacă cutiile Petri însămânţate cu diluţii conţin sub 10 colonii, nu se iau în consideraţie decât în cazul când se păstrează raportul de diluţie.

Calculul numărului total de germeni raportat la 1 ml apă, se realizează folosind formula:

$$Nr.\ total\ de\ germeni/ml = \frac{n \cdot d}{N}$$

în care:

n = numărul total de colonii dezvoltate în cutiile Petri;
d = inversul diluţiei probei însămânţate;
N = numărul de cutii Petri luate în considerare.

În cazul apariţiei în mai multe cutii Petri a germenilor *Proteus* şi *Pseudomonas*, apa va fi considerată suspectă şi determinarea se repetă la o probă de apă nou recoltată. Dacă se obţine acelaşi rezultat şi de această dată, trebuie luate măsuri pentru recondiţionarea sursei sau instalaţiei de apă respective.

a) Determinarea numărului probabil de germeni coliformi totali

♦ Germenii coliformi reprezintă un indicator complementar de poluare adaptat pentru depistarea precoce a poluări apei.

Termenul de "coliformi totali" se referă în mod obişnuit la un grup de bacterii aparţinând familiei *Enterobacteriaceae*. Acest termen a constituit un obiect de dispută între bacteriologi până când s-a ajuns la un rezultat acceptabil. Astfel bacteriologia acvatică defineşte prin **coliformi totali** grupul de microorganisme care fermentează lactoza la 35°C - 37°C cu producere de acid şi gaz în timp de 24-48 ore.

♦ **Coliformii totali** prezenţi în apă provin din materiile fecale ale animalelor cu sânge cald (om, alte mamifere, păsări). Se mai pot

găsi în număr redus pe sol şi pe plante. Un număr destul de mare de coliformi totali există în apele în care se găsesc plantele în descompunere sau pe pompele de aducţiune a apei potabile, pe materialele de natură celulozică din conducte, pe materii organice din sistemul de distribuţie a apei potabile etc.

♦ **Coliformii totali** sunt bacili Gram-negativi nesporulaţi, capabili să se dezvolte în prezenţa sărurilor biliare, să fermenteze lactoza sau alţi compuşi cu carbon (galactoza, manoza, maltoza, dextrine, arabinoza, xiloza, manitol, sorbitol etc.).

♦ **Coliformii totali** fac parte din familia *Enterobacteriaceae*, cu următoarele genuri:

- genul *Escherichia* - *Escherichia coli*;
- genul *Citrobacter* - *Citrobacter freundii*;
- genul *Klebsiella* - *Klebsiella pneumoniae, K. ozenae, K. rhinoscleromatis*;
- genul *Enterobacter* - cu specii grupate astfel:
  * subgrupul A: *Enterobacter cloacae*;
  * subgrupul B: *Enterobacter aerogenes*;
  * subgrupul C: *Enterobacter liquefaciens*.

♦ Pentru determinarea numărului probabil (MPN) de coliformi totali din apă se foloseşte metoda tuburilor multiple care constă dintr-un test de prezumţie - examenul preliminar şi un test de confirmare - examenul definitiv. Testul de prezumţie constă în însămânţarea unor volume determinate de apă în tuburi cu medii de cultură lichide pe bază de lactoză. După incubarea la 37°C un anumit timp se cercetează formarea acidului şi gazului, rezultate din fermentarea lactozei. Se vorbeşte despre un test de prezumţie, pentru că reacţia

pozitivă observată poate să rezulte şi de la alte microorganisme cau combinaţii de microorganisme. Pentru a se confirma prezenţa grupului coliformilor trebuie să se procedeze la un test suplimetar - de confirmare cu ajutorul unui alt mediu de cultură selectiv.

Prin urmare, însămânţând un anumit număr de tuburi cu volume de apă apropiate şi bazat pe ipoteza că incubarea va fi urmată de creşterea în fiecare tub care a primit unul sau mai mulţi coliformi viabili, se poate obţine o estimare statistică a numărului probabil (MPN) de coliformi conţinuţi într-un volum de apă stabilit.

Este o metodă aplicabilă la toate felurile de apă, iar echipamentul necesar este relativ ieftin şi puţin specializat.

Materiale necesare:

- eprubete sterile cu tuburi de fermentare Durham în interior;
- pipete gradate sterile;
- cutii Petri sterile cu diametrul de 10 cm;
- probe de apă;
- apă sterilă;
- bulion lactozat;
- bulion lactozat dublu concentrat;
- geloză lactozată - eozină - albastru de metilen (mediu EMB sau mediu Levine).

Tehnica de lucru:

Testul prezumtiv (examenul preliminar):

Ca medii de cultură pentru acest test se folosesc:

BCU IAŞI

♦ **Bulion lactozat** cu următoarea compoziţie:

extract de carne	3 g
peptonă	5 g
lactoză	5 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 6,8 - 7,0

Sterilizare la 115°C, timp de 20 minute.

♦ **Bulion lactozat dublu concentrat** cu următoarea compoziţie:

extract de carne	6 g
peptonă	10 g
lactoză	10 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 6,7 - 6,8

Sterilizare la 115°C, timp de 20 minute.

Din probele de apă pentru analiză se fac însămânţări în felul următor:

♦ 5 eprubete care conţin fiecare câte 10 ml bulion lactozat dublu concentrat şi tuburi Durham în interior se însămânţează cu câte 10 ml apă de analizat;

♦ 5 eprubete care conţin fiecare câte 10 ml bulion lactozat şi tuburi de fermentare se însămânţează cu câte 1 ml apă;

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

♦ 5 eprubete care conţin fiecare câte 10 ml bulion lactozat şi tuburi de fermentare se însămânţează cu câte 1 ml apă diluată 1/10.

Când apa este poluată sau nu se cunoaşte gradul de poluare, se va însămânţa în continuare în acelaşi mod din diluţiile următoare: 1/100, 1/1.000, 1/10.000.

Eprubetele însămânţate se introduc în termostat şi se incubează la 37°C timp de 24-48 ore. După 24 ore de incubare se face o primă citire şi efectuarea confirmării pentru eprubetele pozitive, considerându-se pozitive acelea în care se evidenţiază fermentarea lactozei cu producere de gaz (prezent în tuburile de fermentare Durham), oricât de mică ar fi cantitatea de gaz degajată.

La 48 ore se face citirea definitivă şi trecerile pentru testul de confirmare din toate eprubetele pozitive, cu excepţia celor care s-au confirmat la 24 ore.

Testul de confirmare (examenul definitiv):

Pentru a preciza dacă germenii care au fermentat lactoza sunt coliformi şi nu alte specii microbiene dotate cu aceleaşi proprietăţi (lactobacili, ciuperci), din fiecare eprubetă considerată pozitivă la testul prezumtiv se fac însămânţări cu ansa în prealabil flambată, în eprubete ce conţin mediul McConkey şi tuburi de fermentare Durham.

Mediul McConkey are următoarea compoziţie:

BCU IASI/CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

taurocolat de sodiu	5 g
lactoză	10 g
NaCl	5 g
brom-crezol-purpur	2 g
peptonă	20 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 7,2

Sterilizare la 115°C, timp de 20 minute.

Eprubetele însămânţate se incubează la 37°C timp de 48 ore. Se confirmă prezenţa germenilor coliformi dacă în eprubete se observă producerea de gaz care se acumulează în tuburile Durham şi producerea de acid care se pune în evidenţă prin virarea culorii mediului de la violet (iniţial) la galben (în final).

Determinarea numărului cel mai probabil (MPN) de coliformi totali la 100 ml apă se face cu ajutorul tabelului, luându-se în considerare eprubetele confirmate.

Pentru fiecare diluţie efectuată se notează numărul de eprubete pozitive. MPN se calculează prin alegerea diluţiilor în modul următor: se alege ultima diluţie pentru care toate tuburile sunt pozitive şi următoarele două diluţii în care sunt şi tuburi negative.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Exemplu:

Diluția probei	Tuburi pozitive
10	5
1	5 (x)
0,1	3 (x)
0,01	2 (x)
0,001	0

Dacă s-a înregistrat numărul 5-3-2, adică în cea de a doua diluție avem 5 tuburi pozitive, în a treia 3 tuburi pozitive, în a patra 2 tuburi pozitive, vom căuta în tabel numărul 5-3-2 căruia îi corespunde valoarea MPN de 140 (Tabelul 9).

Numărul probabil de germeni coliformi totali/100 ml apă se obține prin adăugarea unui număr de zerouri egal cu diferența dintre prima diluție luată în calcul (10) și prima diluție citită din tabel (9):

$$MPN\ (532) = 140 \times 10 = 1400\ \textit{coliformi totali}$$

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 9

Stabilirea numărului cel mai probabil de germeni coliformi (totali şi fecali)/100 ml apă

Numărul eprubetelor pozitive din:			Numărul cel mai probabil (MPN) de germeni coliformi/100 ml probă de apă
5 eprubete conţinând fiecare 10 ml probă de apă	5 eprubete conţinând fiecare 1 ml probă de apă	5 eprubete conţinând fiecare 0,1 ml probă de apă	
0	0	0	<2
0	0	1	2
0	1	0	2
0	2	0	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	6
1	2	0	6
2	0	0	4
2	0	1	7
2	1	0	7
2	1	1	9
2	2	0	9
2	3	0	12
3	0	0	8

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul eprubetelor pozitive din:			Numărul cel mai probabil (MPN) de germeni coliformi/100 ml probă de apă
5 eprubete conţinând fiecare 10 ml probă de apă	5 eprubete conţinând fiecare 1 ml probă de apă	5 eprubete conţinând fiecare 0,1 ml probă de apă	
3	0	1	11
3	1	0	11
3	1	1	14
3	2	0	14
3	2	1	17
3	3	0	17
4	0	0	13
4	0	1	17
4	1	0	17
4	1	1	21
4	1	2	26
4	2	0	22
4	2	1	26
4	3	0	27
4	3	1	33
4	4	0	34
5	0	0	23
5	0	1	30

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul eprubetelor pozitive din:			Numărul cel mai probabil (MPN) de germeni coliformi/100 ml probă de apă
5 eprubete conținând fiecare 10 ml probă de apă	5 eprubete conținând fiecare 1 ml probă de apă	5 eprubete conținând fiecare 0,1 ml probă de apă	
5	0	2	40
5	1	0	30
5	1	1	50
5	1	2	60
5	2	0	50
5	2	1	70
5	2	2	90
5	3	0	80
5	3	1	110
5	3	2	140
5	3	3	170
5	4	0	130
5	4	1	170
5	4	2	220
5	4	3	280
5	4	4	350
5	5	0	240
5	5	1	300

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul eprubetelor pozitive din:			Numărul cel mai probabil (MPN) de germeni coliformi/100 ml probă de apă
5 eprubete conţinând fiecare 10 ml probă de apă	5 eprubete conţinând fiecare 1 ml probă de apă	5 eprubete conţinând fiecare 0,1 ml probă de apă	
5	5	2	500
5	5	3	900
5	5	4	1600
5	5	5	>1600

16.2.2. METODELE DE ANALIZĂ COMPLEMENTARĂ

a) Determinarea numărului total de germeni care se dezvoltă la 22°C

Se efectuează ca în cazul determinării numărului total de germeni care se dezvoltă la 37°C, cu deosebirea că incubarea se face la 22°C, timp de 48 ore.

b) Determinarea numărului probabil de germeni coliformi prin metoda membranelor filtrante

Metoda se aplică în următoarele cazuri:

- când trebuie determinat rapid numărul de germeni coliformi în maximum 20 ore, în loc de 48 ore;
- când se presupune o impurificare redusă a apei de

analizat şi este necesară însămânţarea unui volum de probă de apă mai mare decât cel prevăzut în metodele descrise anterior;

- când proba de apă conţine o cantitate mare de săruri dizolvate, acestea putând inhiba fermentarea lactozei;
- când transportul probei până la laborator durează prea mult timp şi astfel este necesară însămânţarea probei la locul recoltării.

Metoda nu poate fi aplicată în cazul probelor de apă care conţin un număr mare de germeni sau un număr mic de germeni coliformi, precum şi la probele cu conţinut mare de suspensii sau cu turbiditate mare (alge, mâl, etc.).

Materiale necesare:

- dispozitiv de filtrare sub vid, constituit dintr-un filtru Seitz cu diametrul de 3 cm montat la un balon Kitasato steril;
- membrane filtrante cu diamtrul de 3 cm şi mărimea porilor de 0,7 μm, sterile;
- pompă de vid sau pompă de apă;
- rondele de hârtie de filtru cu diametrul de 3 cm, sterile;
- pipete gradate, sterile;
- cilindri gradaţi, sterili;
- cutii Petri, sterile;
- pensete sterile;
- mediul Endo.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica de lucru:

Mediul Endo are următoarea compoziţie:

extract de carne	5 g
peptonă	10 g
agar	20 g
	pH = 7,6

Sterilizare la 115°C, timp de 20 minute.

După repartizarea mediului în baloane acesta se va steriliza din nou prin autoclavare la 121°C, timp de 30 minute.

În paralel, se prepară şi următoarele soluţii:

- soluţie sterilă de lactoză 20% (sterilizarea se face prin autoclavare la 115°C, timp de 20 minute);
- soluţie sterilă de sulfit de Na 10% (sterilizarea se face prin autoclavare la 115°C, timp de 20 minute);
- soluţie saturată alcoolică de fucsină bazică.

În momentul întrebuinţării, la 100 ml mediu lichefiat şi răcit la 55°C se adaugă, în condiţii de sterilitate, 5 ml din soluţia de lactoză 20%. Într-o eprubetă aparte se pipetează 1 ml din soluţia alcoolică de fuxină bazică peste care se adaugă picătură cu picătură din soluţia de sulfit de Na, agitând continuu, până se obţine decolorarea sau până apare o nuanţă rozie. Acest mestec decolorat de fuxină se adaugă şi el peste geloza nutritivă şi după agitare se toarnă în plăci Petri sterile.

Dispozitivul de filtrare se pregăteşte pentru filtrare. Pe placa suport a filtrului Seitz se aşază una sau două rondele de hârtie de filtru şi se umezesc cu 2 sau 3 picături de apă de robinet sterilă. Cu o pensă sterilă se ia o membrană filtrantă şi se aşază peste rondela de hârtie,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

apoi se montează armătura superioară a filtrului Seitz. Dispozitivul de filtrare se racordează la pompa de vid şi se filtrează sub vid slab (prin aspiraţie) un volum de probă de apă. Volumul probei de apă este în funcţie de numărul probabil de germeni coliformi la 100 ml probă de apă. Din proba de apă se vor filtra 3 sau 4 volume care trebuie să difere între ele ca mărime, astfel ca să se obţină 20 până la 50 colonii de germeni pe fiecare membrană filtrantă. În cazul când volumul probei de apă de analizat este mai mic de 30 ml, înainte de filtrare se va completa la minimum 30 ml cu apă de robinet sterilă.

Pentru fiecare probă de apă se va folosi un alt dispozitiv de filtrare. După filtrarea volumelor de probă de apă, fiecare membrană filtrantă se ia cu pensa sterilă şi se aşază cu suprafaţa pe mediul Endo din câte o cutie Petri, evitând formarea de bule de aer între membrană şi mediul de cultură. Cutiile Petri se introduc în termostat pentru incubare la 37°C, timp de 18-20 ore.

Prezenţa germenilor coliformi se confirmă dacă pe membrana filtrantă aşezată pe mediul Endo se formează colonii de culoare purpuriu-verzuie cu luciu metalic pentru *Escherichia coli*, roşii până la roşcate, bombate, mucoase pentru ceilalţi coliformi, faţă de cele incolore ale germenilor lactozonegativi.

Stabilirea numărului de germeni coliformi/100 ml apă

Cu ajutorul unei lupe se numără toate coloniile de germeni coliformi rezultate pe suprafaţa unei membrane filtrante şi numărul de germeni coliformi se calculează după formula:

în care:

$$Nr.\ de\ germeni\ coliformi/100\ ml\ apa = \frac{n}{V} \times 1000$$

n = numărul de coloni de germeni coliformi dezvoltate pe o membrană filtrantă;

V = volumul probei de apă filtrat pe membrana filtrantă (ml).

Rezultatul final va fi dat de media rezultatelor obținute pe fiecare membrană filtrantă.

c) Determinarea numărului probabil de coliformi fecali

♦ Coliformii fecali sunt bacili Gram-negativi, nesporulați, oxidazo-negativi, capabili să fermenteze lactoza la 44 ± 0,5°C cu producere de acid și gaz. De asemenea ei formează indol pornind de la triptofan, la aceeași temperatură.

♦ Coliformii fecali aparțin în cea mai mare parte genului *Escherichia* și în mai mică măsură genurilor *Enterobacter, Citrobacter* și *Klebsiella*.

* Metoda de determinare a numărului probabil de coliformi fecali se aplică în cazul epidemiilor hidrice și al impurificării permanente a apei.

Materiale necesare:

Sunt identice cu cele descrise la pagina 302. În plus, se folosește și mediul cu triptofan care are în compoziție:

triptonă	10 g
apă distilată	1.000 ml

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica de lucru:

Din fiecare eprubetă în care a avut loc fermentarea lactozei când s-a efectuat testul prezumtiv se fac însămânţări pe mediu de cultură pentru confirmare. Primul test de confirmare foloseşte mediul McConkey. Al doilea test de confirmare constă în incubarea la 44 ± 0,5°C timp de 24 ore a mediului cu triptofan însămânţat. Pentru citirea rezultatelor se adaugă câte 1 ml reactiv Kovacs în fiecare eprubetă şi se agită. După 10 minute, reacţiile pozitive sunt indicate prin apariţia unui inel de culoare roşie la suprafaţa mediului de cultură.

Stabilirea numărului probabil de germeni coliformi fecali (MPN)

Aprecierea cantitativă a numărului probabil de germeni coliformi fecali la 100 ml probă de apă se face cu ajutorul tabelului 9.

Prezenţa germenilor coliformi fecali în proba de apă indică o contaminare sigură şi recentă cu fecale şi necesită măsuri sanitare imediate.

În cazul mediilor solide, se vor face treceri din fiecare eprubetă considerată pozitivă, pe câte un sector al câte unei cutii Petri cu mediu EMB (Levine) ce conţine:

peptonă	10 g
KH_2PO_4	2 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 ml
	pH = 7,4

Sterilizarea se face la 121°C, timp de 30 minute.

În momentul întrebuinţării, mediului topit pe baia de apă i se mai adaugă:

- 5 ml soluţie lactoză 20%;
- 2 ml soluţie apoasă eozină galbenă 2%;
- 1,3 ml soluţie apoasă albastru de metilen 0,5%.

Lactoza, eozina şi albastrul de metilen vor fi sterilizate în prealabil (115°C,20 minute).

Incubarea se face la 37°C timp de 24 ore. Prezenţa coliformilor este confirmată dacă pe mediu s-au dezvoltat colonii caracteristice (colonii plate de culoare albastru-verzui, cu luciu metalic sau bombate, opace, mucoase, de culoare roz cu centrul vânăt). Din coloniile dezvoltate se fac frotiuri şi se colorează Gram. În frotiuri trebuie să se pună în evidenţă bacili nesporulaţi, Gram negativi.

Determinarea indicelui coli şi a titrului coli

Gradul de impurificare a unei ape poate fi stabilit şi cu ajutorul metodei de determinare a **indicelui coli**, respectiv a **titrului coli**.

Prin **indicele coli** se înţelege numărul de germeni coli care se găsesc într-un litru de apă analizată.

Titrul coli reprezintă cea mai mică cantitate de substrat analizat, exprimat în ml, în care se descoperă prezenţa bacilului coli.

Pentru determinarea indicelui coli şi a titrului coli se foloseşte metoda Bulir. Metoda constă în însămânţarea de cantităţi descrescânde din apa de analizat în eprubete cu tuburi de fermentare Durham care

conţin 5 ml bulion manitat simplu (0,25%) sau dublu (0,5%), având ca indicator roşul neutru. Din apa de analizat se însămânţează într-o serie de eprubete câte 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml şi 0,001 ml. Eprubetele se incubează la 43°C, timp de 24 ore. În eprubetele în care reacţia este pozitivă, mediul capătă o culoare galbenă fluorescentă şi apare gaz în tubul de fermentare Durham. Citirea rezultatelor se face conform tabelului 10, ţinându-se cont de cantitatea de apă însămânţată pe întreaga serie de eprubete.

Tabelul 10

Valorile indicelui coli şi ale titrului coli

Volumul apei însămânţate				Indicele coli (%)	Titrul coli (%)
1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml		
-	-	-	-	sub 900	peste 1,11
-	-	-	+	900	1,11
-	-	+	-	900	1,11
-	+	-	-	950	1,05
-	-	+	+	1800	0,56
-	+	-	+	1900	0,53
-	+	+	-	2200	0,46
+	-	-	-	2300	0,43
-	+	+	+	2800	0,36
+	-	-	+	9200	0,11
+	-	+	-	9400	0,10
+	-	+	+	18000	0,06
+	+	-	-	23000	0,04
-	+	-	+	96000	0,01
+	+	+	-	238000	0,004
+	+	+	+	peste 238000	sub 0,004

d) Determinarea numărului probabil de streptococi fecali (MPN)

♦ Prezenţa în apă a streptococilor fecali este în general un indiciu al poluării fecale. Aceste microorganisme au fost izolate din ape fecaloid menajere, ape de şiroire rezultate în urma ploilor şi a furtunilor, ape din crescătorii piscicole, dejecte umane şi ale diferitelor mamifere domestice şi sălbatice, din plante şi insecte.

Numărul lor este mai mare decât al coliformilor fecali în dejecţiile rezultate de la fermele de animale, de la câini, pisici şi diferite animale sălbatice. Apele de şiroire conţin de asemenea un număr mai crescut de streptococi fecali decât de coliformi fecali. Dimpotrivă, dejecţiile umane şi apele fecaloid-menajere conţin de cel puţin 4 ori mai mulţi coliformi fecali decât streptococi fecali.

Speciile *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus avium* sunt indicatori ai poluării fecale cu dejecte de la mamifere şi păsări. Aceste trei specii de streptococi nu rezistă mult în afara tractului digestiv, fiind rapid inactivate în mediul ambiant. Deci prezenţa lor în apă constituie un indicator sensibil al poluării fecale foarte recente.

Speciile *Streptococcus faecalis* şi *Streptococcus faccium* sunt prezente în fecalele umane şi sunt indicatori ai unei poluări mai vechi datorită rezistenţei mărite la condiţiile de mediu.

♦ Streptococii fecali sunt coci Gram pozitivi, imobili, izolaţi sau în perechi şi lanţuri scurte. Sunt capabili să crească şi să se multiplice la temperatura de 45°C în prezenţa unei concentraţii de 40%

săruri biliare şi azidă de sodiu (inhibitoare pentru coliformi şi majoritatea celorlalte bacterii Gram negative), şi de 6,5 % clorură de sodiu. Streptococii fecali sunt nesporulaţi. *Streptococcus bovis* şi *Streptococcus equinus* au necesităţile de nutrienţi mai reduse, capacitate mai redusă decât alte specii de a creşte la pH extrem, precum şi temperatură şi la concentraţie în săruri diminuate.

♦ Din familia *Streptococcaceae*, mai frecvent întâlniţi în apele poluate sunt:

- ♦ *Streptococcus faecalis*;
- ♦ *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*;
- ♦ *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*;
- ♦ *Streptococcus faecium* var. *durans*;
- ♦ *Streptococcus equinus*;
- ♦ *Streptococcus avium*;
- ♦ *Streptococcus bovis*.

♦ Determinarea prezenţei şi numărului streptococilor fecali în apă se face în situaţii speciale, ca în cazul alegerii unei surse de apă, epidemii hidrice, poluări accidentale, în supravegherea unor surse şi staţii de tratare şi dezinfectare a apei potabile, reţele de distribuire deficitare, controlul calităţii dezinfecţiei etc.

♦ Prezenţa streptococilor fecali în apă se pune în evidenţă prin metoda tuburilor multiple, folosind două teste: testul prezumtiv - care constă în însămânţarea din apa de analizat a mediilor de cultură cu bulion-azidă de sodiu simplu şi dublu concentrat, incubate la 35°C timp de 48 ore şi un test de confirmare, prin care din eprubetele pozitive se fac însămânţări în mediu cu bulion-etil-violet-

azidă de sodiu; se incubează la 35°C timp de 24-48 ore pentru a se confirma prezența acestor germeni.

Materiale necesare:

- eprubete sterile cu dimensiunile 16 x 160 mm;
- pipete gradate sterile;
- probe de apă;
- apă sterilă;
- mediu bulion azidă de sodiu;
- mediu bulion azidă de sodiu dublu concentrat;
- mediu bulion-etil-violet-azidă de sodiu.

Tehnica de lucru:

Testul prezumtiv (examenul preliminar):

Ca medii de cultură pentru acest test se folosesc:

- **Mediu bulion azidă de sodiu** cu următoarea compoziție:

extract de carne	4,5	g
triptonă sau polipeptonă	15,0	g
glucoză	7,5	g
NaCl	7,5	g
azidă de sodiu	0,2	g
apă distilată	1.000	ml

pH = 7,2 ± 0,2

Sterilizarea la 115°C, timp de 20 minute.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

♦ **Mediu bulion azidă de sodiu - dublu concentrat** cu următoarea compoziție:

extract de carne	9	g
triptonă sau polipeptonă	30	g
glucoză	15	g
NaCl	15	g
azidă de sodiu	0,4	g
apă distilată	1.000	ml

Însămânțarea se realizează în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 ml mediu cu bulion-azidă de sodiu dublu concentrat folosind 20 ml din proba de apă de analizat, în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 ml mediu cu bulion-azidă de sodiu folosind 1 ml din diluția 1/10 a apei de analizat ș.a.m.d.

Eprubetele însămânțate se introduc în termostat și se incubează la 37°C ± 0,5°C timp de 48 ore.

La 48 ore se face citirea testului de prezumție și se fac treceri pentru testul de confirmare din toate eprubetele unde s-a notat apariția turbidității cu sau fără sediment.

Testul de confirmare

Pentru confirmarea streptococilor fecali se trece cu o pipetă Pasteur una sau două picături din fiecare eprubetă considerată pozitivă la testul de prezumție în câte o eprubetă cu mediu bulion-etil-violet-azidă de sodiu (sau mediu McConkey) pentru confirmare.

BCU IASI - BIBLIOTECA UNIVERSITARA - LIBRARY

♦ Mediu bulion-etil-violet-azidă de sodiu are următoarea compoziție:

triptonă	20	g
glucoză	5	g
NaCl	5	g
fosfat dipotasic	2,7	g
fosfat monopotasic	2,7	g
azidă de sodiu	0,4	g
etil-violet	0,00083	g
apă distilată	1.000	ml

pH = 7,0 ± 0,2

Sterilizarea la 115°C, timp de 20 minute.

Probele se incubează la 44,5°C, timp de 24-48 ore. Virarea culorii mediului în galben cu sediment pe fundul eprubetei atestă prezența strptococilor fecali în apă și confirmă originea fecală a poluării.

♦ Determinarea numărului probabil de streptococi fecali (MPN) la 100 ml apă se face cu ajutorul tabelului 9.

Comitetul de Experți ai Oficiului Regional O.M.S. pentru Europa recomandă ca pe lângă metoda tuburilor multiple de decelare a streptococilor fecali în apă, să se folosească asociat și una din metodele cantitative de numărare a coloniilor de streptococi fecali cum ar fi: metoda încorporării în placă, metoda membranei filtrante sau metoda diseminării în placă, în situația când se supraveghează calitatea apei din centre populate cu peste 1 milion de locuitori.

BCU IAȘI - BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

16.3. EXAMINAREA MICROBIOLOGICĂ A AERULUI

Microflora aerului este formată din microorganisme foarte diferite care provin din sol, ape, organisme vii şi care aparţin tuturor categoriilor sistematice: bacterii şi spori bacterieni, drojdii, sproi de mucegaiuri, alge şi protozoare etc.

Rezistenţa acestor microorganisme la diferiţi factori diferă foarte mult. Microorgansimele proprii mediului extern sunt foarte rezistente pe când germenii de provenienţă umană au o rezistenţă mult mai mică.

Aerul din încăperile locuite conţine un număr mai mare de microorganisme decât aerul liber, acesta fiind în majoritate de provenienţă umană.

Cunoaşterea microflorei aerului din diferite încăperi (dintre care unii germeni pot fi patogeni) prezintă o deosebită importanţă sanitaro-epidemiologică. Ea constituie un indicator preţios pentru aprecierea gradului de poluare a aerului, a condiţiilor igienice din diferite spaţii închise.

Metode de analiză microbiologică a aerului

În analiza microbiologică a aerului se determină numărul de microorganisme, considerându-se că acestea, prin densitatea lor, ar putea indica, într-o măsură mai mare sau mai mică, gradul de impurificare a aerului.

Repartizarea neuniformă a germenilor în aer şi lipsa unei metode unice de cercetare şi exprimare a rezultatelor, nu au permis

încă stabilirea de norme acceptate în aprecierea gradului de impurificare a aerului.

Pornind de la principiile tehnice de recoltare a microorganismelor din aer, metodele actuale de cercetare se împart astfel:

- metode de sedimentare;
- metode aspirative.

În funcţie de mediile de recoltare folosite, metodele de cercetare a aerului se clasifică în:

1. Metode care folosesc pentru recoltare **medii solide.**

La baza acestor metode stau mai multe principii: principiul aspiraţiei, termoprecipitării, electroprecipitării combinate cu aspiraţia, aparate cu sită etc.

2. Metode care folosesc pentru recoltare **medii lichide.**

Principiile de bază ale acestor metode sunt: principiul barbotării, de pulverizare a lichidului etc.

3. Metode care se bazează pe filtrarea aerului prin filtre fibroase (vată, tifon), filtre de membrană, filtre din materiale solubile, filtre din materiale sintetice.

Metodele moderne implică procedeul de determinare a microorganismelor din aer utilizând sistemul "Sterifil Milipore".

16.3.1. Metode de sedimentare

Metoda de sedimentare Koch este larg folosită pentru măsurarea gradului de impurificare microbiană a atmosferei din încăperile locuite. Această metodă constă în *expunerea plăcilor Petri*

cu geloză simplă sterilă, timp de 5-10 minute în diverse locuri ale spațiului cercetat. Numărul plăcilor expuse variază în funcție de dimensiunile încăperii. Plăcile se așază la distanță de circa 1-1,5 m de pereți, menținând o distanță de aproximativ 2 m între cutii, în așa fel ca toată suprafața încăperii să fie împânzită cu acestea. Înălțimea la care se așază cutiile diferă după scopul care se urmărește.

Când se urmărește determinarea microflorei eliminate din căile respiratorii, cutiile Petri se așază la aproximativ 1 m. Atunci când se urmărește gradul de curățire generală, cutiile se așază mai aproape de podea, la 0,1 - 0,3 m înălțime.

Timpul de expunere poate varia de la mai puțin de 5 minute la mai mult de 15 minute, după starea de încărcare microbiană a atmosferei. În cazul în care se face o expunere mai prelungită în aerul intens impurificat, se produce o confluență a coloniilor, fapt ce împiedică o numărătoare corectă.

În timpul determinărilor geamurile și ușile trebuie să fie închise și este interzisă orice fel de mișcare.

Incubarea se face la 37°C, timp de 48 ore (în cazul mediilor pentru bacterii) și la 28°C, timp de 72 ore (mediile pentru ciuperci și actinomicete).

Numărul de germeni se determină după formula:

$$Numarul\ de\ germeni/m^3 = \frac{N \times 10000}{S \times K}$$

BCU IASI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

În care:

N = numărul de colonii dezvoltate pe suprafaţa plăcii Petri;

S = suprafaţa plăcii Petri în cm^2;

K = coeficientul timpului de expunere (o unitate pentru fiecare 5 minute de expunere).

Metoda sedimentării este larg folosită în cercetările curente, deoarece este o metodă simplă, accesibilă, permiţând o apreciere obiectivă, deşi relativă, a gradului de impurificare a aerului din încăperi.

În afară de determinarea numărului global de germeni se mai pot determina şi anumite specii considerate drept indicatori ai gradului de poluare (streptococul hemolitic, streptococul viridans, stafilococul).

16.3.2. Metode aspirative

Acestea pot fi metode de filtrare prin corpuri solide, de filtrare prin lichide (barbotarea aerului prin apă zaharată 1% sterilă, prin bulion de carne sau prin ser fiziologic, sterile) şi metode de coliziune care constau în dirijarea jetului de aer aspirat pe suprafaţa mediilor nutritive solide şi însămânţarea directă a suprafeţei mediului fără nici o intervenţuie ulterioară.

Dintre metodele de filtrare a aerului prin diferite lichide care reţin microorganismele, **metoda Laveran** este accesibilă şi mai uşor de realizat.

Metoda Laveran se bazează pe folosirea unui barbotor alcătuit din două eprubete lungi E_1 şi E_2 unite la partea superioară printr-un

tub orizontal T (Fig. 50). Eprubetele se închid prin dopuri de cauciuc prin mijlocul cărora trece câte o pipetă care trebuie să ajungă până aproape de fundul eprubetelor.

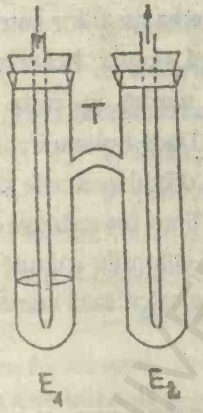


Fig. 50. Barbotorul Laveran.

Deschiderea pipetelor se astupă cu dopuri de vată. Pipeta din eprubeta E_1 este marcată la 10 ml, iar pipeta din eprubeta E_2 este gradată în zecimi de mililitru. Eprubetele astfel pregătite, se împachetează în hârtie şi se sterilizează timp de 30 minute la 121°C.

Modul de lucru. Se înlătură dopul de vată al pipetei introdusă în eprubeta E_1 şi se toarnă în eprubetă până la semn, 10 ml bulion de carne steril, în condiţii de strictă sterilitate. Pipeta gradată din eprubeta E_2 se adaptează la sistemul de aspiraţie. Aerul aspirat pătrunde în eprubeta E_1 prin pipetă, barbotează în bulionul de carne

în care sunt reţinuţi germenii şi iese prin pipeta gradată. După aspirarea cantităţii necesare de aer, se spală pipeta, apoi înclinând de mai multe ori aparatul se spală tubul de legătură şi, în cele din urmă şi eprubeta E_2. Bulionul din eprubeta E_2 aspirat prin pipeta gradată se foloseşte pentru însămânţarea mediilor nutritive: 1 ml din acest bulion se adaugă la 20 ml geloză simplă, lichefiată şi răcită la 45°C. După omogenizare mediul se toarnă în cutia Petri. Se vor efectua 3 însămânţări de acest fel. Dacă bulionul conţine un număr prea mare de germeni se pot efectua diluţii zecimale şi apoi din fiecare diluţie se fac 3 însămânţări. Cutiile Petri însămânţate se încubează la 37°C, timp de 48-72 ore. Se numără coloniile apărute atât la suprafaţă cât şi în profunzimea mediului şi se calculează numărul de germeni la 1 m^3 de aer.

16.4. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI ŞI A PRODUSELOR LACTATE

Compoziţia chimică complexă a laptelui oferă un mediu nutritiv optim pentru dezvoltarea microorganismelor.

Laptele normal, mulş chiar în condiţii aseptice, poate conţine microbi. Prezenţa aproape constantă a microorganismelor în lapte se datorează atât pătrunderii acestora în mamelă din mediul extern cât şi filtrării prin epiteliul mamar a microbilor pe care animalul îi conţine în umorile sale.

Laptele provenit de la animalele sănătoase, întreţinute în condiţii igienice şi obţinut după o mulgere igienică până la asepsie, conţine, în mod normal, între 300-600 germeni/ml.

În lapte se găsește o **microfloră de fermentație lactică** alcătuită din:

- bacterii lactice homofermentative:
  - genul *Lactobacillus*:
    - * *L. lactis*;
    - * *L. delbrukii*;
  - genul *Streptococcus*:
    - * *S. lactis*;
    - * *S. cremoris*;
- bacterii lactice heterofermentative:
  - genul *Leuconostoc*:
    - * *L. mesenteroides*.

Alături de acestea este întâlnită și o microfloră de poluare în care sunt incluse mai multe grupe de bacterii din mai multe familii:

- familia *Enterobacteriaceae* - genul *Escherichia* (*Escherichia coli*), genul *Aerobacter* (*Aerobacter aerogenes*);
- familia *Bacillaceae* - genul *Bacillus* (*Bacillus mycoides, Bacillus subtilis, Bacillus mezentericus*), genul *Clostridium* (*Clostridium butyricum, Clostridium sporogenes*);
- familia *Pseudomonadaceae* - genul *Pseudomonas* (*P. fluorescens*);
- familia *Micrococcaceae* - genul *Micrococcus* (*M. freudenreichii, M. caseolyticus*), precum și diverși enterococi sau alte bacterii cromogene și peptonizante;
- familia *Mycobacteriaceae* - *M. tuberculosis*.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin lapte se pot transmite o serie de boli ca: tuberculoza, bruceloza, febra aftoasă, antraxul, salmonelozele, infecţii stafilococice şi streptococice etc. De aceea controlul microbiologic al laptelui şi produselor lactate se impune cu necesitate pentru a stabili starea igienico-sanitară a produsului.

Examenul microbiologic al laptelui şi produselor lactate urmăreşte:

- determinarea numărului total de germeni;
- determinarea numărului probabil de bacterii coliforme;
- determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri.

Pentru laptele crud destinat fabricării brânzeturilor se determină şi încărcătura în bacterii anaerobe sporulate (proba Veinzirl).

Deoarece examenele microbiologice directe sunt destul de laborioase şi necesită mult timp, deseori se folosesc teste expeditive pentru determinarea indirectă a numărului de microorganisme din lapte, cum este cel de reducere cu albastru de metilen, resazurină, verde Janus (testul sau proba reductazei).

Recoltarea probelor şi alegerea acestora se stabileşte prin standardele (normele) interne ale produselor respective.

16.4.1. Determinarea numărului total de germeni

Prin această determinare se urmăreşte gradul de contaminare a produşului.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Materiale şi medii nutritive necesare:

- cutii Petri sterile cu diametrul de 10 cm;
- pipete gradate sterile de 1 ml, 5 ml şi 10 ml;
- geloză simplă, agar-bulion de carne-peptonă-lactoză sau agar-zer de lapte-peptonă;
- apă de robinet sterilă.

Mediul de cultură agar-bulion de carne-peptonă-lactoză are următoarea compoziţie:

zeamă de carne	1.000	ml
peptonă	10	g
lactoză	10	g
NaCl	5	g
agar	18	g

pH = 7,2 - 7,4

Sterilizarea la 110°C, timp de 30 minute.

Mediul agar-zer de lapte-peptonă se compune din:

zer de lapte	1.000	ml
peptonă	10	g
NaCl	5	g
agar	18	g

Mediul are acelaşi pH iar sterilizarea se face în aceleaşi condiţii.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modul de lucru: este cel descris la începutul acestui capitol, cu deosebirea că în acest caz se vor utiliza şi alte medii de cultură.

16.4.2. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme

Gradul de contaminare a laptelui sau a produselor lactate reflectă condiţiile igienico-sanitare ale proceselor de fabricaţie.

Pentru determinarea numărului de germeni coliformi se poate aplica testul prezumtiv şi cel de confirmare descrise la analiza bacteriologică a apei.

În industria laptelui se utilizează mai frecvent mediul Kessler-Swenarton cu următoarea compoziţie:

bilă de bou proaspătă, filtrată	50	ml
peptonă	10	g
lactoză	10	g
violet de genţiană 1%	4	ml
apă de robinet	1.000	ml

Se adaugă peptona şi bila de bou în apă. Se fierbe 30 minute, amestecând continuu. Se sterilizează în autoclav 30 minute, la 115°C, după care se filtrează prin vată. Se adaugă apoi lactoza şi se completează cu apă distilată la volumul de 1.000 ml. Se ajustează pH-ul mediului la valoarea 7,4 - 7,6. Se adaugă violetul de genţiană şi se filtrează. Se repartizează în eprubete câte 5 ml în care se introduc tuburi Durham. Se sterilizează în autoclav, la 115°C, timp de 30 minute. După sterilizare, tuburile Durham trebuie să fie lipsite de aer.

Din probele supuse analizei se efectuează diluţii zecimale (10^{-1}

- 10^{-5}). Se poate lucra şi cu produsul nediluat. Din fiecare diluţie se însămânţează câte 1 ml în 3 eprubete cu mediu, evitând formarea bulelor.

Incubarea durează 48 ore la 37°C. Se urmăreşte apariţia bulelor de gaz în tuburile Durham. În cazul în care au apărut bule de gaz în una sau mai multe eprubete, gazul ocupând cel puţin 1/10 din înălţimea tubului de fermentaţie, tubul este pozitiv.

Stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme se face prin numărarea eprubetelor pozitive la ultimele diluţii în care testul este pozitiv. În acest scop, se întocmeşte un tabel în care se trece numărul eprubetelor pozitive în cazul fiecărei diluţii (exemplu tabelul 11).

Tabelul 11

Stabilirea eprubetelor pozitive pentru germenii coliformi

Numărul eprubetei	Diluţie					
	produs nediluat	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	-	-

În acest caz, ultimele 3 diluţii la care a apărut reacţia pozitivă sunt 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, iar numărul eprubetelor cu reacţie pozitivă este 3. 2. 1. Pentru această combinaţie se caută în tabelul nr. 12 şi se găseşte cifra 15. La această valoare citită se adaugă atâtea zerouri câte diluţii cu reacţie pozitivă au fost neglijate. În cazul exemplului de mai sus, se adaugă un zero şi deci numărul probabil de bacterii coliforme la 1 ml de lapte sau 1 g produs lactat va fi 150.

Tabelul 12

Stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme din lapte

Nr. eprubetelor din ultimele 3 diluţii la care s-a produs reacţie pozitivă	Nr. probabil de bacterii coliforme	Nr. eprubetelor din ultimele 3 diluţii la care s-a produs reacţie pozitivă	Nr. probabil de bacterii coliforme
0 0 0	0,0	2 2 2	3,5
0 0 1	0,3	2 2 3	4,0
0 1 0	0,3	2 3 0	3,0
0 1 1	0,6	2 3 1	3,5
0 2 0	0,6	2 3 2	4,0
1 0 0	0,4	3 0 0	2,5
1 0 1	0,7	3 0 1	4,0
1 0 2	1,1	3 0 2	6,5
1 1 0	0,7	3 1 0	4,5
1 1 1	1,1	3 1 1	7,5
1 2 1	1,5	3 1 2	11,5

Nr. eprubetelor din ultimele 3 diluţii la care s-a produs reacţie pozitivă	Nr. probabil de bacterii coliforme	Nr. eprubetelor din ultimele 3 diluţii la care s-a produs reacţie pozitivă	Nr. probabil de bacterii coliforme
1 3 0	1,6	3 1 3	16,5
2 0 0	0,9	3 2 0	9,5
2 0 1	1,4	3 2 1	15,0
2 0 2	2,0	3 2 2	20,0
2 1 0	1,5	3 2 3	30,0
2 1 1	2,0	3 3 0	25,0
2 1 2	3,0	3 3 1	45,0
2 2 0	2,0	3 3 2	120,0
2 2 1	3,0	3 3 3	140,0

16.4.3. Determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri

Numărul acestor tipuri de microorganisme indică starea condiţiilor igienico-sanitare în procesul de producţie şi păstrare a probelor.

Pentru determinarea numărului de drojdii se poate folosi un mediu de cultură format din:

făină de malţ ..... 250 g
agar ..... 30 g
apă de robinet ..... 1.000 ml

La făina de malţ se adaugă apa, după care se încălzeşte la

57°C şi se menţine la această temperatură timp de o oră. Se ridică apoi treptat temperatura până la 63°C, menţinându-se la această temperatură până când dispare reacţia amidonului cu iodul (nu mai apare culoarea albastră). Se filtrează prin pânză, iar la lichidul obţinut se adaugă agarul, se topeşte şi se filtrează la cald în autoclav, prin vată. Mediul se repartizează în eprubete câte 18-20 ml/eprubetă şi se sterilizează la 121°C, timp de 20 minute.

Pentru determinarea numărului de mucegaiuri se sterilizează mediul următor:

infuzie din 200 g cartofi	1.000 ml
glucoză	20 g
agar	15 g

Pentru obţinerea infuziei de cartofi se fierb 200 g cartofi tăiaţi în felii în 100 ml apă distilată timp de o oră. Amestecul se filtrează prin tifon dublu, prin stoarcere. La filtratul obţinut se adaugă apă distilată până la volumul iniţial de 1.000 ml. Se adaugă glucoza şi se amestecă bine până la completa dizolvare a acesteia. Se adaugă agarul, se topeşte în autoclav la 110°C, timp de 20 minute. Se filtrează prin vată la cald. Mediul se repartizează în eprubete câte 18-20 ml/eprubetă şi se sterilizează în autoclav la 110°C, timp de 30 minute.

În momentul analizei, din diluţiile preparate pentru determinarea numărului total de germeni se fac însămânţări în cutii Petri sterile. Pentru fiecare diluţie se însămânţează, cu câte 1 ml, cel puţin 3 cutii Petri.

Mediul pentru cultivarea drojdiilor se lichefiază pe baia de apă şi se răceşte la 45°C. Înainte de a fi turnat în cutia Petri, la acesta se adaugă 0,2 ml dintr-o soluţie sterilă de acid lactic 5% (sterilizarea

acidului lactic se face la 110°C, timp de 30 minute). Mediul se toarnă în cutia Petri odată cu diluţia, se omogenizează bine iar după solidificare, se pune la incubat la temperatura camerei, timp de 5 zile. După incubare, se numără coloniile dezvoltate şi se face media celor 3 cutii în care s-au numărat coloniile, pentru fiecare diluţie în parte.

Pentru cultivarea mucegaiurilor, se procedează la fel ca la drojdii. Singura deosebire este aceea că la mediul lichefiat şi răcit la 45°C, se adagă 0,1 - 0,5 ml soluţie sterilă de acid tartric 10% (sterilizarea acidului tartric se face la fel ca acidul lactic). Cantitatea de acid tartric se tatonează în aşa fel ca după adăugarea sa, mediul să aibă pH = 3,5. Soluţia de acid tartric se adaugă la mediu după o prealabilă încălzire la 45°C. Incubarea are loc tot la temperatura camerei, durata fiind de 5-10 zile. După incubare, se stabileşte numărul mediu de colonii de mucegaiuri/cutia Petri.

16.4.4. Determinarea încărcăturii laptelui în bacterii sporulate (proba Weinzirl)

Metoda este recomandată pentru laptele destinat fabricării brânzeturilor.

Materiale necesare:

- baie de apă termoreglabilă;
- termostat cu temperatura de 37°C:
- pipete gradate sterile;
- termometre;

♦ eprubete sterile de 16 x 160 mm conţinând fiecare câte 2 cm^3 parafină, sterilizate la 121°C, timp de 30 minute.

Modul de lucru. În 5 eprubete cu parafină, notate în prealabil se introduc, cu o pipetă sterilă, 5 ml lapte de cercetat, fără a atinge pereţii eprubetelor. Toate eprubetele se cufundă în baia de apă termoreglabilă la 80°C. Concomitent se cufundă o altă eprubetă cu lapte în care se introduce termometrul. După atingerea temperaturii, durata de menţinere este de 10 minute. În timpul încălzirii stratul de parafină se topeşte şi se ridică la suprafaţă. Eprubetele se răcesc apoi brusc la jet de apă. Incubarea se face la 37°C, timp de 48 ore, observându-se producerea de gaz, care poate să disloce stratul de parafină în una, două sau mai multe eprubete.

Interpretarea rezultatelor. Se consideră că proba Weinzirl este pozitivă când gazul dezvoltat împinge în sus stratul de parafină solidă. Aprecierea calităţii laptelui se face prin calificative:

♦ **lapte bun** - nici o eprubetă cu gaz;

♦ **lapte satisfăcător** - o eprubetă cu gaz;

♦ **lapte de calitate proastă** - două sau mai multe eprubete cu gaz.

16.4.5. Proba reductazei

Prin proba reductazei se determină în mod indirect numărul de microorganisme din lapte, prin măsurarea activităţii lor metabolice. Această probă se poate efectua cu albastru de metilen, resazurină sau

verde Janus.

Proba reductazei cu albastru de metilen

Această metodă constă în decolorarea laptelui în care s-a adăugat albastru de metilen, în raport cu conținutul în microorganisme. Fenomenul se datorează activității oxido-reducătoare a microorganismelor conținute în lapte. Cu cât numărul acestora este mai mare și cu cât activitatea lor este mai intensă, cu atât fenomenul de decolorare va fi mai rapid.

Tehnica de lucru. Într-o eprubetă sterilă (capacitatea 50 ml) se introduc 0,5 ml dintr-o soluție de albastru de metilen proaspăt preparată** și 20 ml din proba de lapte supusă analizei. Eprubeta se astupă cu un dop steril de cauciuc și se introduce într-o baie de apă la temperatura de 37°C, la adăpost de lumină. Decolorarea se urmărește la 3 intervale de timp: după 20 de minute, după 2 ore și după 5 ore și jumătate. Analiza poate fi considerată terminată când întreaga probă s-a decolorat.

Interpretarea rezultatelor prin acest test este redată în tabelul nr. 13.

** Soluția de albastru de metilen se prepară astfel: 5 ml soluție alcoolică saturată de albastru de metilen se amestecă cu 195 ml apă distilată.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13

Interpretarea rezultatului probei cu albastru de metilen

Intervalul de timp la care a apărut decolorarea	Calitatea laptelui	Clasa	Numărul probabil de germeni la 1 ml lapte
peste 5 ore şi 1/2	bună	I	sub 500.000
de la 5 ore şi 1/2 până la 2 ore inclusiv	satisfăcătoare	II	de la 500.000 până la 4 milioane
sub 2 ore până la 20 minute inclusiv	slabă	III	de la 4 la 20 de milioane
sub 20 minute	foarte slabă	IV	peste 20.000.000

Proba reductazei cu resazurină

Resazurina este o oxazonă care introdusă în lapte dă o coloraţie albastră. Sub acţiunea microorganismelor din lapte este redusă în reserufină de culoare roşie-roz şi apoi în dihidroreserufină incoloră. Pe baza aprecierii nuanţei de culoare la care ajunge amestecul lapte - resazurină după o oră de incubare la 37°C, laptele este clasificat după calitate în 4 grupe (tabelul 14).

Tehnica de lucru. Într-o eprubetă obişnuită se introduce 1 ml resazurină, soluţie apoasă 0,05% sterilă (sterilizată prin tindalizare)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

proaspăt preparată, peste care se adaugă 10 ml din laptele supus analizei. Se închide eprubeta cu dop de cauciuc steril, se omogenizează bine conţinutul şi se introduce pentru o oră la 37°C. După incubare, proba se agită din nou pentru uniformizarea amestecului şi se apreciază nuanţa de culoare.

Tabelul 14

Interpretarea rezultatului probei cu resazurina

Nuanţa de culoare	Calitatea laptelui	Clasa
albastru oţel-albastru palid	bună	I
violet albăstrui-violet roşu	satisfăcătoare	II
roz-roz spre alb	slabă	III
alb	foarte slabă	IV

17. STUDIUL PRINCIPALELOR GRUPE ECOLOGICE DE MICROORGANISME CARE PARTICIPĂ LA CIRCUITUL ELEMENTELOR BIOGENE ÎN NATURĂ

17.1. CIRCUITUL AZOTULUI

Prin termenul *"circuitul azotului"* este desemnat ansamblul transformărilor pe care le suferă azotul în natură. Aceste transformări, dintre care cele mai importante sunt de natură microbiană, joacă un

rol de prim ordin conducând pe de o parte la câştiguri sau la pierderi de azot în sol, iar pe de altă parte la reţinerea lui în sol sub forme asimilabile pentru plante.

Procesele care conduc la îmbogăţirea solului în azot sunt, după natura lor, de două tipuri:

a) **procese de natură microbiană:**

- fixarea azotului atmosferic de către microorganismele libere fixatoare de azot;
- fixarea azotului atmosferic de către microorganismele simbiotice fixatoare de azot;

b) **procese de natură nemicrobiană:**

- aport de azot prin apele meteorice şi apele de irigare;
- adsorbţia amoniacului atmosferic.

17.1.1. Fixarea azotului atmosferic

Fixarea azotului atmosferic de către microorganisme reprezintă o etapă importantă din circuitul azotului. Făcând abstracţie de cantităţile mici de azot molecular care devin accesibile plantelor pe cale fizico-chimică prin fixarea lui în sol în cursul descărcărilor electrice şi cu apele de precipitaţii, cea mai mare parte a azotului atmosferic ar rămâne nefolosită de vieţuitoarele de pe pământ dacă nu ar exista microorganismele fixatoare de azot.

Multă vreme s-a admis că lista microorganismelor responsabile de fixarea azotului atmosferic se limitează la microorganismele chimico-organotrofe aerobe (reprezentanţi ai genurilor *Azotobacter* şi

Beijerinckia) sau anaerobe (genul *Clostridium*) şi microorganismele fotolitotrofe aparţinând grupei de bacterii fotosintetizante şi grupei cyanobacteriilor.

Actualmente se cunoaşte un număr mult mai mare de microorganisme active care intervin în acest proces fie în stare izolată fie în asociaţii sinergice.

După modul lor de viaţă, microorganismele fixatoare de azot se împart în două grupe mari;

a) microorgansime libere fixatoare de azot care pot fi aerobe şi anaerobe;

b) microorganisme simbiotice fixatoare de azot care fixează azotul molecular în nodozităţile plantelor leguminoase (*Rhizobium*) sau neleguminoase (*Frankia*).

17.1.1.1. Microorganisme libere fixatoare de azot

Dintre microorganismele libere fixatoare de azot aerobe, cele mai importante aparţin familiei *Azotobacteriaceae* (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Night Edition, 1989).

Reprezentanţii acestei familii se prezintă morfologic sub forma unor celule mari, predominant bastonaşe, până la oval, dar care îşi pot schimba aspectul morfologic în funcţie de vârsta culturii şi de condiţiile de cultivare. Celulele sunt grupate adesea în perechi şi sunt mobile datorită prezenţei flagelilor peritrichi sau polari. Se cunosc şi forme imobile. Sunt Gram-negative în stadiul tânăr şi Gram-pozitive în stadiul matur. Nu formează endospori. Unele specii formează

chlamidospori (*Azotobacter chroococcum*) sau microchişti rezultaţi din îngroşarea peretelui celulei vegetative şi acumularea unor substanţe de rezervă. Cele mai multe tulpini prezintă o capsulă mucilaginoasă care înconjoară una sau mai multe celule şi care este cu atât mai mare cu cât conţinutul mediului de cultură în glucide este mai ridicat. Unele tulpini produc pigmenţi fluorescenţi. Sunt specii strict aerobe, dar se pot dezvolta şi fixează azotul şi la tensiuni scăzute ale oxigenului în mediu.

Sunt microorganisme heterotrofe, capabile să fixeze azotul molecular într-un mediu fără azot, dar în prezenţa unei surse organice de carbon.

Familia *Azotobacteriaceae* cuprinde 4 genuri:

1. Genul *Azotobacter*, cu speciile: ***Azotobacter chroococcum, Azotobacter beijerinckii, Azotobacter vinelandii, Azotobacter paspali***;

2. Genul *Azomonas*, cu speciile: ***Azomonas agilis, Azomonas insignis, Azomonas macrocytogenes***;

3. Genul *Beijerinckia*, cu speciile: ***Beijerinckia indica, Beijerinckia mobilis, Beijerinckia derxii, Beijerinckia fluminensis***;

4. Genul *Derxia*, cu o singură specie: ***Derxia gummosa***.

Genul *Azotobacter* prezintă o importanţă dosebită în procesul fixării azotului atmosferic.

Cea mai răspândită specie a genului este *Azotobacter chroococcum* ce prezintă o mare variabilitate morfologică. Se cunosc mai

multe tipuri morfologice condiţionate de stadiul de dezvoltare.

Celulele tinere au aspectul unor bastonaşe groase de 2 μm x 4 μm cu capetele rotunjite, izolate sau în perechi, ciliate peritrich. Celulele adulte sunt ovalare sau cu aspectul unor coci mari de 2 μm x 1,2 μm şi conţin numeroase granulaţii. Celulele bătrâne sunt aproape sferice, numărul flagelilor scade şi celulele îşi pierd mobilitatea. Datorită prezenţei capsulei gelatinoase preparatele de *Azotobacter chroococcum* au un aspect deosebit: celulele se găsesc întotdeauna la o anumită distanţă între ele.

Este aerob şi facultativ microaerofil. Formează la suprafaţa mediilor lichide o peliculă colorată brun până la negru, datorită melaninei.

Temperatura optimă de dezvoltare este de 25-28°C şi pH-ul 7-7,5.

Este Gram-negativ în stadiul tânăr şi Gram-variabil la maturitate.

Azotobacter chroococcum se întâlneşte aproape în toate solurile, frecvenţa cea mai mare fiind în solurile cultivate, fertile.

Izolarea şi cultivarea bacteriilor din genul *Azotobacter*

În acest scop se pot folosi diferite medii de cultură. Cel mai adesea se foloseşte un mediu nutritiv cu manită sau glucoză (conceput şi modificat de S. ASHBEY), mediu care are următoarea compoziţie:

glucoză . . . . . 20 g
$MgSO_4$ . . . . . 0,2 g
KH_2PO_4 . . . . . 0,2 g
NaCl . . . . . 0,2 g
K_2SO_4 . . . . . 0,2 g
$CaCO_3$ . . . . . 5 g
apă distilată . . . . . 1.000 ml

Mediul se repartizează în balonaşe de 100 cm^3, se sterilizează la 0,5 atm. (115°C) timp de 20 minute şi se însămânţează cu o mică cantitate de sol gras de grădină. Se incubează la 25-28°C. După 7-10 zile se observă formarea la suprafaţa lichidului de cultură a unei pelicule la început de culoare gri-albicioasă care apoi devine brun-închis. Din această peliculă se efectuează preparate care se supun examenului microscopic.

Dacă la acest mediu lichid se adaugă 15-18 g‰ agar se obţine un mediu solid care după sterilizare se răceşte la 45-50°C şi se repartizează în cutii Petri sterile. Concomitent cu turnarea mediului în fiecare placă se depune câte 1 ml suspensie de sol diluată. Se imprimă plăcilor o mişcare de rotaţie pentru amestecarea suspensiei de sol cu mediul de cultură. După solidificarea mediului, plăcile Petri sunt incubate timp de 4-5 zile la 25-28°C. După acest interval de timp se constată dezvoltarea unor colonii de *Azotobacter* colorate în galben-brun închis. Prin repicări repetate şi control microscopic se obţin, în final, culturi pure de *Azotobacter*.

Pentru cultivarea speciilor de *Azotobacter* se poate folosi şi agarul cu extract de morcovi, mediu propus de C. STAPP. O cantitate de 500 g morcovi tocaţi fin se fierb timp de 30 minute în 1.000 ml

apă de robinet. După completarea apei evaporate, se neutralizează extractul cu o soluţie de 0,3% Na_2CO_3. Se îndepărtează precipitatul prin filtrare şi se adaugă filtratului agar în proporţie de 2 g%. Mediul se sterilizează 30 minute la o atmosferă. După însămânţare şi incubare timp de 7-8 zile la 25-28°C, se obţin culturi luxuriante de *Azotobacter*.

O apreciere sumară asupra bogăţiei unui sol în *Azotobacter* poate fi făcută simplu şi rapid printr-o tehnică propusă de S. WINOGRADSKY, denumită "solul moulei". Solul de examinat este el însuşi mediu de cultură, după încorporarea unei substanţe carbonate organice uşor utilizată de *Azotobacter* şi o umezire prealabilă. *Azotobacter* se dezvoltată electiv la suprafaţă, formând adevărate colonii.

Tehnica de lucru: Se cântăresc cca 100 g sol cernut şi omogenizat în care se încorporează 1 g piruvat de Na. Se aduce cu apă sterilă până la o consistenţă păstoasă amestecând viguros cu o lamă de sticlă flambată. Se repartizează solul astfel preparat în cutii Petri mici cu diametrul de 5-6 cm şi cu o lamă de sticlă se netezeşte suprafaţa. Cutiile Petri se introduc apoi fără capac într-un recipient mai mare (în care trebuie să se menţină o atmosferă umedă) şi se incubează la 27°C timp de 6 zile. După 3 şi 6 zile se examinează plăcile Petri şi se observă coloniile de *Azotobacter* care au aspectul unor pete strălucitoare şi uşor detaşabile. Spre a patra zi ele încep să se brunifice. Se apreciază bogăţia în *Azotobacter* după numărul coloniilor. Absenţa coloniilor nu înseamnă întotdeauna şi absenţa lui *Azotobacter* din sol. Solul carenţat în fosfor sau calciu nu permite dezvoltarea coloniilor în condiţiile descrise mai sus.

O altă grupă de bacterii libere fixatoare de azot molecular o

formează cele anaerobe care aparţin mai multor genuri. Dintre acestea o importanţă deosebită prezintă genul *Clostridium* din familia *Bacillaceae*.

Clostridium pasteurianum se prezintă în stadiu vegetativ sub formă de bastonaşe drepte sau uşor curbate de 0,5-0,8/3,4-13,2 μm şi sub formă de fus în stadiu sporulat. Sporii sunt deformanţi şi dispuşi central, terminal şi subterminal. Sporul matur este înconjurat de o capsulă gelatinoasă de formă triunghiulară cu capetele puţin rotunjite. Prezenţa acestei capsule este caracteristică pentru *Clostridium pasteurianum*.

În unele condiţii de cultivare, această bacterie dă forme de involuţie cu aspecte din cele mai bizare: filamente lungi cu spori la unul din capete sau uneori se observă desfacerea celulelor într-o serie de formaţiuni asemănătoare cocilor.

În celulele tinere citoplasma este omogenă şi se colorează cu IIK în galben. Înainte de a începe sporularea apare în ea glicogen şi incluziuni de amidon, din care cauză cu IIK se colorează în albastru. După maturarea sporului coloraţia dispare.

Clostridium pasteurianum este mobil, cu flageli dispuşi peritrich, uneori imobil. Este strict anaerob sau anaerob- aerotolerant Temperatura optimă de dezvoltare este 28-30°C. Se dezvoltă bine în medii ce conţin hidraţi de carbon fementescibili. Este o bacterie butirică adevărată producând în cursul fermentării hidraţilor de carbon, acid butiric, acid acetic şi gaze.

Pentru dezvoltarea şi izolarea acestei bacterii se foloseşte următorul mediu:

glucoză ..... 20 g
KH_2PO_4 ..... 1 g
$MgSO_4$ ..... urme
NaCl ..... 0,5 g
$FeSO_4$ ..... urme
$MnSO_4$ ..... urme
apă distilată ..... 1.000 ml

Mediul se repartizează în balonaşe cu fundul plat cu capacitatea de 100 ml şi se adaugă în fiecare vas câte 2 g $CaCO_3$. Se însămânţează cu sol şi se incubează la 25-30°C. După câteva zile la suprafaţa mediului apare o peliculă formată din bacterii aerobe, iar pe fundul vasului începe fermentarea butirică cu o degajare abundentă de gaze. *Clostridium pasteurianum* se dezvoltă în depozitul de $CaCO_3$ de pe fundul vasului, de unde se ia material pentru efectuarea preparatelor.

Numeroase alte specii de *Clostridium* pot fixa azotul dar în cantităţi reduse. În general s-a constatat că speciile de *Clostridium* fixatoare de azot atmosferic au o răspândire mai mare decât speciile aerobe de *Azotobacter*. Datorită modului lor de viaţă anaerob şi a pH-ului optim relativ scăzut, ele se pot găsi în solurile mai puţin aerisite, precum şi în solurile de pădure şi păşune compacte şi acide. Ele sunt prezente însă şi în solurile cultivate, bine aerisite şi bogate în humus. În acest caz sunt prezente aproape exclusiv în interiorul particulelor structurale ale solului. În majoritatea cazurilor ele acceptă, ca şi fixatoarele de azot aerobe, o simbioză cu bacteriile celulozolitice.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

17.1.1.2. Bacteriile simbiotice fixatoare de azot atmosferic

Bacteriile implicate în fixarea simbiotică a azotului la leguminoase aparţin familiei ***Rhizobiaceae*** - genul ***Rhizobium*** şi formează nodozităţi pe rădăcinile leguminoaselor. Speciile acestui gen sunt răspândite de regulă în rizosferă. Celulele bacilare au diametrul de 1-1,4 x 0,6-0,8 μm. Sunt Gram-negative, ciliate şi foarte mobile. În nodozităţile rădăcinilor leguminoaselor, celulele bacteriene iau forme de T, X şi Y. Sunt bacterii aerobe, heterotrofe şi nu formează spori. Temperatura optimă de dezvoltare este de 25°C.

Principalele specii ale genului ***Rhizobium*** sunt:

♦ ***Rhizobium leguminosarum*** - celule cu diametrul de 0,5-0,9 μm şi o lungime de 1,2-3,0 μ. Pe medii de cultură formează colonii albicioase şi mucilaginoase. Celulele sunt flagelate petritrich. În sol se găsesc pe rădăcinile plantelor de ***Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens***.

♦ ***Rhizobium phaseoli*** - celule mai mici decât la ***Rhizobium leguminosarum***, flagelate peritrich. Coloniile sunt gri-albicioase şi mai puţin mucilaginoase ca la ***Rhizobium leguminosarum***. În sol se găsesc pe plantele de ***Phaseolus vulgaris, Phaseolus angustifolius*** şi ***Phaseolus multiflorus***.

♦ ***Rhizobium trifolii*** - celule flagelate peritrich. Formele bacteroide capătă rar forme de X şi Y. Celulele sunt în majoritatea cazurilor piriforme şi prezintă vacuole. Depozitele bacteriene sunt iniţial albe, iar mai târziu colorate în gri şi cu aspect de masă gumoasă. Ele se găsesc în nodozităţile rădăcinilor de

Trifolium sp. şi în sol.

♦ *Rhizobium japonicum* - celule flagelate monotrich. Formează colonii gri-albicioase şi se găsesc în nodozităţile rădăcinilor de *Glycine, Vigna, Crotularia, Arachis, Phaseolus.*

♦ *Rhizobium lupini* - celule care se deplasează cu ajutorul a 2-3 flageli. Se distinge uşor de celelalte specii de *Rhizobium.* Se găseşte în sol şi în nodozităţile rădăcinilor de *Lupinus, Ornithopus.*

Formele infecţioase de *Rhizobium*, adică formele care pătrund prin perişorii absorbanţi în ţesuturile rădăcinii, poartă numele de bacteroizi. O caracteristică structurală a bacteroizilor este prezenţa unei membrane de acoperire (manşon) care înveleşte unul sau mai mulţi bacteroizi. Se pare că acest manşon este produs de celulele plantei gazdă cu rol de a izola, într-o anumită măsură, bacteroizii de celulele radiculare. În momentul când nodozităţile se pigmentează în roşu, începe şi fixarea azotului molecular. O secţiune longitudinală printr-o nodozitate, în această fază, arată 4 zone de ţesuturi diferenţiate:

♦ zona corticală externă sau cortexul nodozităţii, formată din celule parenchimatice;

♦ zona meristematică, în care celulele se divid;

♦ sistemul vascular, dispus sub cortex şi separat de acesta prin endoderma nodozităţii;

♦ zona centrală infectată, separată de sistemul vascular prin mai multe rânduri de celule parenchimatice.

Pentru izolarea şi cultivarea bacteriilor din nodozităţi, se spală bucăţi de rădăcini recoltate încă înainte de înflorire, mai întâi în apă

de robinet şi apoi de mai multe ori în apă distilată.

Cu un cuţit steril se taie câteva nodozităţi şi se depun timp de 1-2 minute într-o soluţie de 0,1 % sublimat, după care se spală rapid cu apă sterilă de 5-6 ori pentru prevenirea acţiunii sublimatului. Având toată grija de a se evita o infectare cu agenţi străini, se deschide şi se prelevează o porţiune dintr-o nodozitate. Se mărunţeşte într-un mojar de porţelan steril cu câţiva ml de ser fiziologic şi din maceratul obţinut se însămânţează cu o baghetă pe un extract de leguminoase ce conţine agar sau gelatină, mediu propus de M. BEIJERINCK. Pentru aceasta se prepară un decoct din planta gazdă cercetată la care se adaugă 0,25% asparagină, 0,5% zaharoză şi 10% gelatină sau 1,5% agar. Reacţia mediului trebuie să fie slab acidă. *Rhizobium leguminosarum, Rhizobium phaseoli, Rhizobium trifolii* şi *Rhizobium meliloti* se dezvoltă mai bine pe mediu cu gelatină şi extract de leguminoase decât pe mediu nutritiv cu agar. Pentru speciile *Rhizobium lupini* şi *Rhizobium japonicum* se recomandă extractul de leguminoase agarizat datorită faptului că aceste bacterii se dezvoltă lent.

După izolarea acestor bacterii se pot obţine culturi pure efectuând un control macroscopic şi microscopic continuu.

17.1.2. Proteoliza

Substanţele proteice de origine vegetală şi animală sunt supuse unui proces de mineralizare sub acţiunea microorganismelor proteolitice. La degradarea proteinelor participă o microfloră foarte bogată şi puţin specializată.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY

Printre microorganismele proteolitice, cele mai frecvente sunt: *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus mesentericus, Bacillus megaterium, Bacillus anthracis, Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Escherichia coli, Sarcina lutea.* Există organisme proteolitice şi printre ciuperci, streptomicete, dar activitatea lor este mult mai slabă decât a majorităţii bacteriilor şi ciupercilor.

Aceste microorganisme degradează macromoleculele proteice la compuşi mai simpli (peptone, peptide, aminoacizi etc.) sub acţiunea proteazelor microbiene extracelulare.

Proteoliza este o etapă nespecifică realizată de o microfloră heterotrofă nespecifică.

Etapa specifică este legată de activitatea biologică a unor microorganisme din microflora constantă a solului care utilizează produşii amintiţi rezultaţi din etapa precedentă.

Pentru evidenţierea fenomenului de proteoliză se poate folosi o metodă simplă - metoda Lauthraup. Se folosesc fâşii de film developat de 6 cm lungime şi 0,5 cm lăţime, sterilizate prin tindalizare. Aceste benzi se introduc în tuburi de hemoliză care conţin 2 ml soluţie Winogradsky sterilă, diluată 1/20. Se însămânţează fiecare tub cu 1 ml diluţie din proba de analizat. După câteva zile, în cazul unei reacţii pozitive, filmul atacat devine transparent datorită atacului microbian asupra păturii fine de gelatină de pe film, în timp ce porţiunea din afara mediului rămâne neagră.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17.1.3. Amonificarea

Este o altă etapă importantă din circuitul biologic al azotului ce constă în descompunerea substanţelor proteice vegetale şi animale, precum şi a altor substanţe cu azot, până la NH_3, CO_2 şi H_2O.

Procesul de amonificare are loc sub acţiunea unei microflore bogate şi puţin specializate, ce aparţine la toate grupele sistematice dar ponderea cea mai mare o deţin bacteriile. Cele mai active sunt: ***Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Escherichia coli, Bacillus mycoides, Bacillus mesentericus, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Bacillus putrificus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens*** etc., dintre bacterii, iar dintre ciuperci ***Oidium lactis, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Rhizopus nigricans***.

Pentru evidenţierea procesului de amonificare precum şi a microorganismelor care îl realizează se foloseşte efectul selectiv al unor medii nutritive speciale care oferă condiţii de dezvoltare a acestora.

Materiale necesare:

- eprubete de 22/2 cm sterile;
- eprubete de hemoliză;
- pipete gradate sterile;
- baloane indice iod sterile;
- cilindri sterili, mojar de sticlă steril;
- medii de cultură;
- reactiv Nessler;
- probă de sol.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se însămânţează cu suspensii - diluţii de sol un mediu lichid salin, la care se adaugă asparagină ca sursă de C şi N şi se cercetează apariţia NH_3 cu reactivul Nessler.

Mediul de cultură:

soluţie salină standard	50 ml
asparagină	0,5 g
bacto-peptonă	0,1 g
tripticază	0,1 g
extract de levuri	0,1 g
soluţie de oligoelemente	0,1 ml
apă distilată	până la 1.000 ml

Mediul se repartizează câte 10 ml în eprubete şi se sterilizează 20 minute la 115°C.

Soluţia salină standard (Winogradsky):

K_2HPO_4	5 g
$MgSO_4$	2,5 g
NaCl	2,5 g
$Fe(SO_4)_3$	0,05 g
$MnSO_4$	0,05 g
apă distilată	1.000 ml

pH = 7-7,5
(se ajustează cu NaOH 10%)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARA LIBRARY

Soluția se repartizează în flacoane și se sterilizează 20 minute la 121°C.

Soluția de oligoelemente:

molibdat de K	0,05 g
borat de Na	0,05 g
perclorură de Fe	o picătură
azotat de cobalt	0,05 g
sulfat de cadmiu	0,05 g
sulfat de cupru	0,05 g
sulfat de zinc	0,05 g
sulfat de mangan	0,05 g
apă distilată	1.000 ml

Se lasă să treacă prin soluție un curent de CO_2.

Tehnica de lucru. Se cântăresc 10 g din proba de sol și se trec într-un mojar steril. Se mojarează solul cât mai fin posibil și se transvazează într-un balon indice iod cu capacitatea de 300 ml, cu 100 ml apă sterilă. Se agită balonul la un agitator mecanic timp de 30 minute pentru realizarea unei suspensii omogene. Se realizează astfel diluția de sol 1/10 sau 10^{-1}. Din această diluție se transferă cu o pipetă sterilă 10 ml în al doilea balon indice iod care conține 90 ml apă sterilă. Se agită din nou la agitatorul mecanic 10 minute și se obține, diluția 1/100 sau 10^{-2}. În același mod se realizează și diluțiile următoare. Suspensiile diluții de sol obținute, se folosesc imediat la însămânțarea mediilor de cultură.

Se însămânțează câte 3 eprubete cu mediu pentru fiecare

diluţie cu câte 1 ml de suspensie de sol. Se incubează la 28°C.

Citirea rezultatelor se face la anumite intervale de timp: 3, 5, 7, 10 şi 15 zile, în modul următor: se prelevează steril cu o pipetă gradată câte 1 ml din fiecare eprubetă însămânţată, începându-se cu diluţia cea mai mare spre cea mai mică şi se pune într-o eprubetă de hemoliză. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte 2 picături de reactiv Nessler. Se agită în mână eprubeta. Apariţia unei culori galben-oranj indică prezenţa NH_3 în mediu.

Pentru evidenţierea microorganismelor amonificatoare, se efectuează preparate din depozitul de pe fundul eprubetelor cu reacţie pozitivă, care se colorează Gram şi se examinează la microscop.

17.1.4. Nitrificarea

În urma procesului de amonificare în sol se acumulează NH_3. Când condiţiile ecologice sunt favorabile, NH_3 este oxidat pe cale biologică până la azotaţi, proces care poartă numele de nitrificare. Acest proces este realizat de microorganisme numite nitrificatoare care pot fi autotrofe şi heterotrofe.

Nitrificarea autotrofă este realizată de două grupe de bacterii înalt specializate, care îşi procură întreaga energie de care au nevoie din oxidarea azotului amoniacal sau nitros. Procesul se petrece în două etape succesive (nitritarea şi nitratarea), fiecare etapă constând dintr-o serie de reacţii specifice care implică anumite grupe de bacterii.

Nitritarea este procesul oxidării NH_3 până la nitriţi care se realizează cu participarea unor specii ce aparţin genurilor *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrospira, Nitrosogloea, Nitrocystis*.

Nitratarea sau oxidarea nitriților în nitrați ce pot fi utilizați de plante, este realizată de următoarele bacterii nitrice mai importante: *Nitrobacter winogradskyi, Nitrobacter agilis* și unele specii de *Nitrocystis*.

Pentru evidențierea acestor două etape ale procesului de nitrificare și a microorganismelor implicate se însămânțează suspensii diluții de sol pe medii lichide elective, repartizate în eprubete.

Mediul de cultură pentru bacteriile nitroase:

soluție salină standard	50 ml
sulfat de amoniu	0,5 g
carbonat de calciu	1 g
apă distilată	950 ml

Mediul de cultură pentru bacteriile nitrice:

soluție salină standard	50 ml
azotit de sodiu	1 g
carbonat de calciu	1 g
apă distilată	950 ml

Se repartizează fiecare mediu în tuburi de hemoliză, câte 1 ml de tub. Se sterilizează la autoclav 10 minute la 115°C.

Se însămânțează câte 5 tuburi de diluție, cu 0,5 ml suspensie de sol pentru fiecare tub. Se incubează 20 zile la termostat la 28°C.

Se cercetează apoi prezența nitriților sau nitraților cu difenilamină sulfurică, preparată astfel:

difenilamină	10 g
acid suifuric	1.000 g

BCU IASI

Acest amestec se varsă peste 20 ml apă distilată.

Citirea rezultatelor. Pentru evidenţierea **nitriţilor**, se golesc aproape complet tuburile de hemoliză, aşa fel încât să nu conţină mai mult de 1-2 picături de mediu. Se pun apoi în fiecare tub 10 picături de acid sulfuric şi 10 picături de difenilamină sulfurică. Prezenţa nitriţilor (tuburi pozitive) se traduce prin apariţia unei culori albastre intense la concentraţii mari, uneori trecătoare la concentraţii limită.

Pentru punerea în evidenţă a **nitraţilor** în mediul de cultură, se golesc aproape complet tuburile şi se adaugă în fiecare tub cca 50 mg uree, 10 picături de acid sulfuric şi 10 picături de difenilamină sulfurică. Prezenţa nitraţilor se traduce prin aceeaşi coloraţie albastră ca mai sus.

Din depozitul de pe fundul eprubetelor în care reacţia nitriţilor şi nitraţilor este pozitivă, se fac frotiuri, se colorează Gram şi se examinează la microscop.

17.1.5. Denitrificarea

Este procesul de reducere a nitraţilor în urma căruia pot rezulta compuşi chimici foarte variaţi: nitriţi, amoniac, azot molecular.

Denitrificarea constituie, în general, un proces dăunător deoarece diminuează cantitatea de azot asimilabil din sol.

Speciile de microorganisme capabile să producă denitrificarea completă până la N_2O sau N_2, respectiv microorganismele denitrificatoare specifice sunt puţine. Ele aparţin genurilor ***Bacillus, Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus, Spirillum***. Marea majoritate a

microorganismelor denitrificatoare sunt heterotrofe deşi se cunosc şi câteva specii autotrofe (*Thiobacillus denitrificans*).

Pentru evidenţierea procesului de denitrificare se însămânţează suspensii diluţii de sol într-un mediu lichid în care azotul se află sub formă de nitraţi.

Mediul de cultură are următoarea compoziţie:

soluţie salină standard	50 ml
azotat de potasiu	20 g
glucoză	10 g
carbonat de calciu	5 g
soluţie de oligoelemente	1 ml
apă distilată	până la 1.000 ml

Mediul se repartizează în tuburi de 22/2 cm, cu câte 10 ml şi se sterilizează la autoclav 20 minute la 115°C.

Însămânţarea se face cu 1 ml suspensie diluţie de sol pentru fiecare tub. Se însămânţează câte 3 tuburi de fiecare diluţie şi se incubează la termostat la 28°C.

După 7-15 zile de incubare se prelevează steril din fiecare tub cu o pipetă Pasteur sterilă, 2 picături de lichid începând cu diluţia cea mai mare şi se introduc în tuburi de hemoliză. Se cercetează în toate tuburile prezenţa nitraţilor cu difenilamină sulfurică, după ce s-au eliminat nitriţii care se pot forma. În fiecare tub se adaugă 50 mg uree, 10 picături de acid sulfuric şi 10 picături de difenilamină sulfurică. În eprubetele în care au rămas nitraţi apare coloraţia albastră (tuburi negative). Eprubetele în care nitraţii au dispărut sunt incolore (tuburi pozitive). În alte eprubete reacţia poate fi parţială.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17.2. CIRCUITUL CARBONULUI

Carbonul ca principal element chimic biogen intră în componenţa tuturor substanţelor organice.

Circuitul carbonului în natură prezintă o importanţă primordială şi se realizează printr-o diversitate de mecanisme şi în mai multe etape.

Una dintre aceste etape o reprezintă mineralizarea substanţelor organice şi degajarea bioxidului de carbon.

Materia organică prezentă în sol sau bazinele acvatice este deosebit de variată, sursa sa principală fiind reprezentată de resturile vegetale (frunze moarte, tulpini, rădăcini, fructe), cadavre animale, dejecte animale, microorganisme moarte, substanţe organice sintetice etc. Toate aceste substanţe sunt supuse unor procese de biodegradare prin variate mecanisme biochimice. Indiferent de natura acestor procese şi de produşii intermediari formaţi, biodegradarea are ca ultim scop mineralizarea totală a substanţelor organice şi eliminarea CO_2.

Din marea varietate a substanţelor organice acumulate în sol şi ape, sursa principală a acestora o reprezintă resturile vegetale bogate în hidraţi de carbon şi substanţe aromatice. Biodegradarea acestor substanţe prezintă o importanţă deosebită.

17.2.1. Celulozoliza

Celuloza (polizaharid complex) este componenta principală a ţesuturilor vegetale şi cel mai important compus cu carbon din sol şi ape.

Biodegradarea celulozei până la CO_2 și H_2O poartă numele de celulozoliză și este realizată de o mare varietate de microorganisme celulozolitice, aerobe și anaerobe, aparținând bacteriilor și ciupercilor. Toate aceste microorganisme sintetizează și elimină extracelular celulaza, un complex enzimatic constituit din mai multe componente.

Cele mai importante specii de bacterii celulozolitice sunt: *Vibrio agarliquefaciens, Cellvibrio ochraceus, Cellvibrio flavescens, Cellvibrio fulvus, Cellvibrio vulgaris, Cellulomonas aurogenes, Cellulomonas gelida, Cellulomonas muscosus, Chromobacterium rossicus, Bacillus termocellulolyticus, Bacterium albidum, Streptomyces cellulose, Micromonospora fusca, Cytophaga aurantiaca, Cytophaga lutea, Cytophaga rubra, Clostridium thermocellum* etc.

Dintre ciuperci cele mai active sunt *Trichoderma viride, Aspergillus clavatus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Penicillium claviforme, Penicillium luteum, Penicillium roseum, Penicillium lanosum, Verticillium glaucum* precum și diferite specii ale genurilor *Sporotrichum, Monosporium, Spicaria, Alternaria* etc.

Pentru evidențierea celulozolizei aerobe se folosește următorul mediu:

soluție salină standard	50 ml
azotat de amoniu	1 g
extract de sol	20 ml
soluție de oligoelemente	1 ml
apă distilată	1.000 ml

Mediul se repartizează în eprubete (9 ml/eprubetă), după care în fiecare eprubetă se introduce o bandă de hârtie de filtru calitativă

cu lungimea de 7-8 cm şi lăţimea de 1 cm (celuloza din hârtie reprezintă sursa de carbon şi energie). După repartizarea mediului banda de hârtie trebuie să depăşească nivelul lichidului cu 1-2 cm. Se autoclavează 20 minute la 115°C.

Însămânţarea tuburilor cu mediu se face cu câte 1 ml suspensie de sol şi incubarea la termostat la 28°C timp de 15 zile. După acest interval de timp, cultura germenilor celulozolitici aerobi se traduce cel mai adesea prin apariţia de pete pigmentate pe porţiunea de hârtie de filtru aflată în afara mediului.

Atunci când atacul microbian este puternic, hârtia de filtru se rupe la nivelul suprafeţei lichidului din eprubetă. Când atacul microbian este mai puţin intens, pentru observarea fenomenului este necesar să procedăm la o uşoară agitare, pentru a se detaşa partea inferioară a hârtiei.

Din porţiunile deteriorate ale hârtiei de filtru se prepară frotiuri, se colorează Gram şi se examinează la microscop (obiectivul cu imersie). Se urmăreşte forma şi tipul microorganismelor.

Prepararea extractului de sol. O cantitate de aproximativ 10 Kg de sol cultivat se amestecă în greutate egală cu apă de robinet în baloane de sticlă de capacitate mare. Extracţia se face la cald introducând amestecul în autoclav timp de o oră la 2 atm. La scoaterea lui din autoclav, amestecul se filtrează prin hârtie de filtru, la cald. Pentru a obţine un lichid de filtrare perfect limpede, se pregăteşte o serie de mai multe flacoane de sticlă prevăzute cu câte o pâlnie şi hârtie de filtru. Se trece supernatantul succesiv prin mai multe filtre întotdeauna în aceeaşi ordine. Extractul obţinut se sterilizează la autoclav la 115°C, timp de 30 minute. El trebuie să fie limpede şi cu

tentă de chihlimbar.

Pentru celulozoliza anaerobă se foloseşte următorul mediu:

soluţie salină standard	50	ml
azotat de amoniu	2	g
peptonă Bacto	1	g
extract de sol	20	ml
carbonat de calciu	3	ml
tripticază	0,1	g
extract de levuri	0,1	g
celuloză pulbere	5	g
apă distilată	1.000	ml

Se repartizează câte 8 ml mediu în eprubete în care s-au introdus în prealabil câte un tub Durham. Se sterilizează prin autoclavare 20 minute la 115°C. Se însămânţează fiecare tub cu câte 1 ml suspensie diluţie de sol şi se incubează la 28°C. Celulozoliza anaerobă este însoţită întotdeauna de o degajare de gaz, uşor de pus în evidenţă prin acumularea în tuburile Durham. După 7-15 zile de incubare se notează eprubetele cu reacţia pozitivă.

17.2.2. Amiloliza

Amidonul se acumulează în sol, în cantităţi mari, ca substanţă de rezervă în diferite organe ale plantelor: rădăcini, tuberculi, rizomi, seminţe.

Degradarea amidonului se realizează rapid de către microorganisme (bacterii şi ciuperci). Acestea produc exoenzime (amilaze) care hidrolizează amidonul până la dextrine şi maltoză, iar mai departe

până la glucoză.

Microflora amilolitică nu este specifică, deoarece microorganismele care produc amilaze sunt extrem de variate şi numeroase: bacterii Gram pozitive şi Gram negative, sporulate şi nesporulate, aerobe şi anaerobe, actinomicete şi ciuperci filamentoase.

Pentru evidenţierea procesului de amiloliză şi a microflorei ce îl realizează se foloseşte un mediu de cultură electiv care are următoarea compoziţie:

soluţie salină standard	50 ml
extract de sol	10 ml
amidon	1,5 g
azotat de amoniu	1 g
soluţie de oligoelemente	1 ml
peptonă	0,1 g
tripticază	0,1 g
extract de levuri	0,1 g
apă distilată	până la 1.000 ml

Amidonul din mediu reprezintă singura sursă de carbon. Se repartizează mediul în eprubete câte 10 ml şi se sterilizează la autoclav 20 minute la 110°C.

Însămânţarea se face cu câte 1 ml suspensie de sol pentru fiecare tub şi se incubează la termostat la 28°C. După o incubare de 3-5 zile se prelevează 1 ml din fiecare tub însămânţat şi se introduce într-o eprubetă de hemoliză. Se adaugă câte o picătură de soluţie iodo-

iodurată[***] şi 2-3 ml apă. Dacă hidroliza amidonului este completă, mediul nu va avea decât o uşoara tentă galbenă (reacţie pozitivă). Dacă hidroliza este parţială sau nulă, tenta variază între albastru violet până la roşu închis (reacţie negativă).

Pentru observarea microflorei amilolitice, din depozitul de pe fundul tuburilor cu reacţie pozitivă se execută frotiuri care se colorează prin metoda Gram.

17.2.3. Pectinoliza

Pectinele sunt poliuronide formate din polimeri ai acidului d-galacturonic asociaţi, în anumite proporţii, cu pentoze şi hexoze. Pectinele formează substanţa de legătură dintre fibrele celulozice. Ele sunt degradate pe cale aerobă sau anaerobă de către bacterii ce aparţin genurilor ***Bacillus***, ***Pseudomonas***, ***Flavobacterium***, actinomicete (***Streptomyces***, ***Nocardia***) precum şi un număr mare de ciuperci filamentoase din genurile ***Fusarium***, ***Penicillium***, ***Aspergillus***, ***Botrytis***, ***Alternaria***. Toate aceste microorgansime pectinolitice conţin complexul enzimatic cunoscut sub numele de pectinază.

Procesul de descompunere a substanţelor pectice de către microorganisme se poate pune în evidenţă însămânţând cu suspensii - diluţii de sol un mediu salin la care se adaugă pectină ca unică sursă de carbon şi care gelifică mediul. Pectinoliza se apreciază prin lichefierea gelului de pectină în funcţie de timp şi diluţie.

[***] Soluţia iodo-iodurată are compoziţia: 10 g iod, 25 g iodură de potasiu, 1000 ml apă distilată.

Prepararea mediului de cultură

1. Pătura de geloză:

agar	15 g
$CaCl_2$	5 g
apă distilată	1.000 ml

Se topește geloza în soluție de clorură de calciu, se filtrează și se ajustează pH-ul la 7,5. Se repartizează apoi în eprubete câte 3 ml și se sterilizează la autoclav 20 minute la 121°C.

2. Pătura de pectină:

pectină de măr	8 g
azotat de amoniu	2 g
soluție salină standard	50 ml
extract de sol	50 ml
apă distilată	900 ml

Într-un cristalizor se introduce amestecul de săruri, extract de sol și apa, se aduce la 80°C, se introduce pectina la pH = 8 cu NaOH N/10 (circa 5 ml). Se repartizează în stoc pentru sterilizare în tuburi de 22 cm, câte 15-20 ml de fiecare tub. Se autoclavează până la 121°C și se oprește încălzirea ori de câte ori se ajunge la această temperatură. Se reduce astfel la minimum degradarea moleculelor de pectină. În cele din urmă, mediul rămâne, după răcire, lichid și cu pH = 7,2.

Însămânțarea: într-un stativ se așază eprubetele cu pătura de geloză, după care se prelevează steril cu pipeta câte 2 ml mediu cu pectină din tuburile stoc și se repartizează deasupra gelozei. Se adaugă apoi rapid în fiecare tub câte 1 ml suspensie diluție de sol. Difuziunea calciului în pătura de pectină o gelifică în 6 ore. Incubarea se face la

28°C, timp de 1-20 zile.

Citirea rezultatelor poate fi făcută imediat după scoaterea de la termostat. Pectinoliza se traduce prin lichefierea gelului de pectină.

Bacteriile îşi încep activitatea pectinolitică cu mult timp înaintea ciupercilor şi actinomicetelor. Ciupercile îşi încep activitatea numai spre a patra sau a cincea zi, iar actinomicetele mult mai târziu, abia după 15 zile.

Din tuburile cu reacţie pozitivă se efectuează frotiuri, se colorează Gram şi se examinează la imersie.

17.3. CIRCUITUL SULFULUI

Sulful, ca şi celelalte elemente biogene, suferă în natură o serie de transformări ciclice.

Forma sub care sulful se găseşte în natură poate fi minerală (sulf elementar, sulfaţi, sulfuri) sau organică. Plantele verzi utilizează sulful numai sub formă minerală, în principal sub formă de sulfaţi.

Totalitatea transformărilor pe care le suferă în biosferă compuşii organici şi minerali ai sulfului constituie circuitul sulfului.

Principalele etape ale circuitului sulfului sunt:

a) încorporarea sulfului mineral în substanţe organice;
b) mineralizarea sulfului organic;
c) oxidarea compuşilor minerali ai sulfului;
d) reducerea compuşilor minerali ai sulfului.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17.3.1. Mineralizarea sulfului organic

O etapă importantă din circuitul sulfului în natură o reprezintă mineralizarea compușilor organici cu sulf, care reprezintă cantitativ cea mai importantă rezervă de sulf din sol.

Un număr mare de microorganisme heterotrofe (*Proteus, Serratia, Pseudomonas, Clostridium, Aspergillus, Microsporum* etc.) produc mineralizarea sulfului organic. Etapele acestui proces de mineralizare sunt foarte complexe. Activitatea acestor microorganisme se datorește prezenței unor enzime care acționează asupra compușilor organici sulfurați, produșii intermediari și chiar finali fiind foarte variați în funcție de substanța organică mineralizată, de microorganismele care realizează acest proces și de condițiile ecologice în care are loc procesul de mineralizare. În condiții de anaerobioză, produsul final cel mai frecvent este H_2S.

Pentru evidențierea acestui proces, precum și a microflorei ce îl realizează, se fac însămânțări din diluțiile de probe utilizate pe un mediu de cultură lichid (mediul Cahet) cu următoarea compoziție:

K_2HPO_4	0,5 g
glucoză	1 g
peptonă	1 g
soluție de oligoelemente	10 picături
NaCl	5 g

Mediul trebuie să aibă pH-ul 7,5. Se repartizează în eprubete de câte 10 ml și se adaugă înainte de sterilizare în fiecare tub câte un cui. Sterilizarea se face la autoclav, 30 minute la 121°C.

Fiecare eprubetă se însămânţează cu câte 1 ml de diluţie realizată din proba supusă analizei. După însămânţare se adaugă în fiecare tub, în mod steril, câte 3 picături de clorhidrat de cisteină neutralizată 6% (compus organic cu sulf) care se sterilizează prin filtrare la vid. Se incubează la termostat, la 28°C până la 21 zile. Citirea rezultatelor se face faţă de un tub martor (neînsămânţat). Reacţia pozitivă se traduce prin înnegrirea culiului şi a mediului de cultură datorită H_2S rezultat din descompunerea cisteinei care împreună cu sărurile de fier formează sulfura de fier ce dă culoarea neagră.

Din depozitul de pe fundul eprubetelor se fac frotiuri, se colorează Gram şi se examinează la imersie.

17.3.2. Oxidarea compuşilor minerali ai sulfului (sulfoxidarea)

Sulfoxidarea este un proces care se realizează pe cale chimică sau biologică. Sulfoxidarea biologică în sol şi ape poate fi realizată de următoarele grupe de microorganisme: bacterii chimiolitotrofe din genul ***Thiobacillus (T. thioparus, T. novellus, T. denitrificans*** - care este anaerob), bacterii heterotrofe, bacterii chimiolitotrofe din familia ***Beggiatoaceae*** şi bacterii fotolitotrofe din familiile ***Chlorobacteriaceae*** şi ***Thiorhodaceae***. Primele două grupe sunt active mai ales în sol, ultimele două predomină în bazinele acvatice.

Tiobacilii oxidează sulfurile, tiosulfaţii şi sulful elementar până la sulfaţi.

Numeroase microorganisme heterotrofe aerobe (actinomicete,

BCU IASI

levuri, ciuperci filamentoase) sunt capabile să oxideze sulful elementar, tiosulfaţii etc. în sulfaţi.

Hidrogenul sulfurat din ape, nămoluri şi din sol este oxidat în aerobioză de specii ale genurilor ***Beggiatoa, Thiopploca, Thriothrix***. Sulful elementar rezultat se depune intracitoplasmatic sub formă de granule refringente.

În condiţii de anaerobioză, oxidarea sulfurilor (H_2S) este realizată de bacteriile sulfuroase fotosintetizante verzi şi roşii. Aceste bacterii aparţin la 3 familii importante: ***Thiorhodaceae***, ***Chlorobacteriaceae*** şi ***Athiorhodaceae***.

Familia ***Chlorobacteriaceae*** cuprinde numeroase genuri dintre care mai importante sunt: ***Chlorobium (Ch. limicola, Ch. thiosulfatophilum, Ch. chlorocromatium), Chlorobacterium (Cl. symbioticum), Chlorocromatium (Ch. aggregatum), Pelodictyon (P. agregatum, P. paralellum)***.

Chlorobacteriaceele sau bacteriile sulfuroase verzi în marea lor majoritate, nu au fost studiate prin examen microscopic direct în probele de ape sulfuroase. Numai două genuri au putut fi definite mai precis fiind izolate în culturi pure şi studiate morfologic şi fiziologic. Este vorba, în primul rând, de genul ***Chlorobium*** care cuprinde bacterii de talie mică (0,7-0,9 μm/1,5 μm), imobile , ovoide sau sub formă de bastonaşe scurte care adesea se dispun în lanţuri asemănătoare celor de la streptococi. Când se dezvoltă în medii puţin favorabile, celulele tind să ia formă de bacili alungiţi, filamente sau chiar spirale. Al doilea gen, ***Pelodictyon***, cuprinde bacterii de dimensiuni ceva mai mari (0,5-1,5 μm/2-4 μm). Celulele bacteriene se aşază în serii paralele (*P. paralellum*) sau formează reţele (*P.*

clathrotiforme). Bacteriile sulfuroase verzi sunt locuitori permanenți ai bălților mici, murdare, canalelor, râurilor și altor bazine de apă unde se găsesc substanțe organice în descompunere.

Familia *Thiorhodaceae* cuprinde bacteriile sulfuroase purpurii care se diferențiază unele de altele prin forma celulelor sau agregatelor lor. Sunt prezente în apele sulfuroase, apele stagnante etc. Genul cel mai cunoscut este *Chromatium*. Speciile acestui gen prezintă celule de formă ovală, rotundă sau de bastonaș. Sunt mobile cu cilii dispuși monotrich. Celulele cultivate în medii bogate în H_2S prezintă granulații de sulf care dispar atunci când sulfurile din mediu sunt epuizate.

Genul *Thiospirillum* cuprinde specii cu celulele în formă de spirili, mobili, lungi de 30-40 μm (unele din cele mai mari bacterii). Aceste bacterii trăiesc adesea în simbioză cu bacteriile sulfatoreducătoare care le furnizează H_2S.

Pentru determinarea acestor grupe de bacterii se efectuează diluții din diferite probe: apă, apă de sondă, nămol terapeutic etc. și se însămânțează pe medii de cultură corespunzătoare.

Mediul de cultură pentru evidențierea microflorei care oxidează sulful metaloid și hidrogenul sulfurat are următoarea compoziție:

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

K_2HPO_4	0,25	g
$MgCl_2$	0,10	g
NaCl	0,10	g
NO_3NH_4	2	g
$CaCO_3$	5	g
apă distilată	1.000	ml
NaCl	5	g

pH = natural

Se repartizează câte 5 ml de mediu în eprubete şi se sterilizează prin autoclavare timp de 30 minute la 121°C. Pentru prepararea mediului se va folosi un carbonat de calciu lipsit de sulfaţi.

Mediul de cultură pentru evidenţierea microflorei care oxidează tiosulfaţii la sulfaţi are compoziţia următoare:

K_2HPO_4	0,25	g
$MgCl_2$	0,10	g
NaCl	0,10	g
NO_3NH_4	2	g
$CaCO_3$	5	g
$Na_2S_2O_3$	1	g
soluţie de oligoelemente	1	ml
apă distilată	până la 1.000	ml

Se repartizează mediul în eprubete de hemoliză câte 3 ml şi se sterilizează la autoclav 30 minute la 121°C.

Însămânţarea acestor două medii se face cu câte 1 ml suspensie din probă.

În cazul determinării bacteriilor care oxidează sulful metaloid se adaugă aseptic în fiecare eprubetă o anumită cantitate de floare de sulf, iar în cazul oxidării H_2S eprubetele însămânţate se pun într-un exicator în care se introduce un păhărel cu câţiva ml dintr-o soluţie de monosulfură de sodiu 10%. Incubarea se face la 28°C timp de 3săptămâni.

Citirea rezultatelor se face prelevând din fiecare eprubetă însămânţată, fără a se agita, 1 ml lichid clar care se transferă într-o altă eprubetă peste care se adaugă 2 picături de HCl concentrat şi 5 picături dintr-o soluţie de Cl_2Ba 5%. Apariţia imediată a unei tulbureli sau a unui precipitat alburiu indică prezenţa sulfaţilor în mediu. Se compară cu un tub martor neînsămânţat.

Mediul de cultură pentru *Chlorobacteriaceae* şi *Thiorhodaceae* (SCHLEGEL şi PFENING) se compune din:

$MgSO_4$	0,1 g
$MgCl_2$	0,1 g
$CaSO_4$	0,2 g
$CaCl_2$	0,1 g
KCl	0,2 g
acetat de magneziu	0,1 g
extract de levuri	0,02 g
extract de sol	10 ml
agar	10 g
apă distilată	1.000 ml

Mediul se repartizează câte 80 ml în flacoane de 150 ml şi se sterilizează 30 minute la 115°C. În momentul folosirii se lichefiază şi se adaugă următoarele soluţii sterile:

vitamina B_{12}	1 ml
ascorbat de Na 0,5%	1 ml
soluție de oligoelemente	1,7 ml
bicromat de Na 8%	2 ml
monosulfură de Na	2 ml
acid fosforic 4%	0,7 ml

Sterilizarea acestor soluții se face prin filtru Seitz.

Se repartizează mediul în tuburi înalte (Weinberg) de anaerobioză și când temperatura mediului a ajuns la 45°C se însămânțează cu câte 1 ml diluție din probă. Se rulează tubul în mâini timp de câteva minute pentru răspândirea inoculului în toată masa mediului de cultură. Deasupra mediului din eprubetă se toarnă apoi 1-2 ml amestec steril de parafină și ulei de parafină pentru asigurarea condițiilor de anaerobioză.

Incubarea tuburilor însămânțate se face timp de 3 săptămâni la temperatura de 28-30°C și în condiții de expunere la lumină (se folosește un bec de 40 W). După incubare, din coloniile verzi și roșii care s-au dezvoltat în coloana de mediu se fac preparate între lamă și lamelă și se observă la microscop.

17.3.3. Reducerea compușilor minerali oxidați ai sulfului (sulfatreducerea)

În condiții de anaerobioză sulfații sunt reduși în sulfuri, proces numit sulfatreducere. Fenomenul poate avea loc în sol, nămoluri, sedimente marine, ape marine, ape reziduale.

Microorganismele sulfatreducătoare aparțin la două genuri:

a) genul *Desulfovibrio*, vibrion nesporulat, cu speciile *D. desulfuricans, D. vulgaris, D. gigas, D. africanus* etc;

b) genul *Desulfatomaculum*, bacil sporulat, cu trei specii: *D. nigricans, D. orientis, D. ruminus*.

Toate speciile sulfatreducătoare sunt anaerobe stricte şi reduc sulfaţii în H_2S.

Studiul bacteriilor sulfatreducătoare necesită medii de cultură, de izolare şi de conservare specifice.

Mediul de cultură solid pentru izolarea bacteriilor sulfatreducătoare (mediul Postgate) are următoarea compoziţie:

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1 g
Na_2SO_4	1 g
$CaCl_2(6.H_2O)$	1 g
$MgCl_2(7.H_2O)$	2 g
lactat de sodiu (soluţie 60%)	5,6 ml
extract de levuri	1 g
agar	15 g
apă distilată	1.000 ml

Mediul se repartizează câte 10 ml în tuburi şi se autoclavează 20 minute la 115°C.

După autoclavare se adaugă în fiecare tub câte 0,1 ml sulfat de fier 5%, 0,1 ml acid ascorbic 1% şi 0,1 acid tioglicolic 1%. pH-ul se ajustează la valoarea 7,6. Soluţiile se sterilizează prin filtre cu membrană.

Mediul lichid pentru izolarea bacteriilor sulfatreducătoare (mediul Postgate) are compoziţia:

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ BIBLIOTECA

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1 g
$CaCl_2(6.H_2O)$	1 g
$MgCl_2(7.H_2O)$	2 g
lactat de sodiu (soluție 60%)	5,6 ml
extract de levuri	1 g
acid ascorbic	1 g
$FeSO_4.7\ H_2O$	0,5 g

Mediul se repartizează câte 10 ml în tuburi și se autoclavează 15 minute la 121°C. După autoclavare se adaugă în fiecare tub câte 0,1 ml acid tioglicolic 1% și se ajustează pH-ul cu puțin hidroxid de natriu până la 7,6.

Însămânțarea se face cu 1 ml diluție din probele utilizate.

În cazul mediului solid, însămânțarea se face după topirea în prealabil a mediului de cultură și răcirea la 45°C.

Incubarea durează 2 săptămâni la 28-30°C, în condiții de anaerobioză (termostat cu vid sau se toarnă peste mediul din eprubetă un strat de 2-3 ml parafină sterilă).

Reacția pozitivă se traduce prin înnegrirea mediului lichid sau apariția de colonii negre în mediul solid, datorită formării sulfurii de fier.

Prezența vibrionilor sulfatreducători se controlează printr-un examen microscopic al preparatelor realizate din coloniile negre apărute în mediul solid sau din mediul lichid. Observarea se face în contrast de fază sau după colorarea Gram a frotiurilor.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

ANEXA

PREPARAREA COLORANŢILOR ŞI REACTIVILOR

1. Prepararea soluţiei de violet de metil:

violet de metil . . . . . 0,2 g
apă distilată . . . . . 100 ml

Se filtrează prin hârtie. Se foloseşte în coloraţia Gram (pentru coloraţia Gram se pot folosi, cu rezultate mai puţin bune, violet de genţiană sau cristal violet).

2. Prepararea soluţiei de fucsină Ziehl:

soluţie alcoolică saturată de fucsină bazică 10 ml
soluţie 5% fenol în apă distilată . . . . . 100 ml

Se filtrează prin hârtie. Se foloseşte în coloraţia Ziehl-Neelsen. Această soluţie diluată 1/10 cu apă distilată se foloseşte pentru colorații simple sau pentru recolorare în coloraţia Gram.

3. Prepararea soluţiei Lugol:

iod . . . . . 1 g
IK . . . . . 2 g
apă distilată . . . . . 200 ml

Se solvă iodura de potasiu în cca 20 ml apă, se adaugă şi se solvă iodul, apoi de adaugă restul de apă. Se foloseşte ca mordant în coloraţia Gram.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Prepararea soluţiilor alcoolice saturate ale coloranţilor bazici:

colorant (albastru de metilen, violet de genţiană sau fucsină bazică) . . . . . 10 g
alcool etilic 96° . . . . . 100 g

Se mojarează colorantul, se adaugă o parte din alcool şi se continuă mojararea. Se transvazează într-o sticlă cu dop rodat. Restul aloolului se adaugă treptat, în porţiuni mici, pentru a spăla colorantul din mojar, fiecare porţiune transvazându-se apoi în sticlă. Se menţine sticla la 37°C timp de 7 zile cu agitare ocazională. Se filtrează prin hârtie. Filtratul reprezintă soluţia alcoolică saturată a colorantului.

5. Prepararea soluţiei de albastru de metilen alcalin Löeffler:

soluţie alcoolică saturată de albastru de metilen . . . . . 30 ml
soluţie 1% KOH . . . . . 1 ml
apă distilată . . . . . 100 ml

Se foloseşte pentru coloraţii simple sau pentru recolorare în coloraţia Ziehl-Neelsen.

6. Soluţie de safranină:

safranină (soluţie 2,5% în alcool etilic 96°) 10 ml
apă distilată . . . . . 100 ml

BCU IASI - CATEDRA MICROBIOLOGIE LIBRARY

7. Soluție de verde malachit:

verde malachit	5 g
apă distilată	100 ml

8. **Colorantul Nessler:**

Soluție A

albastru de metilen	1 g
alcool 96°	20 ml
acid acetic glacial	50 ml
apă distilată	1.000 ml

Soluție B

cristal violet	1 g
alcool 96°	10 ml
apă distilată	300 ml

În momentul întrebuințării, se amestecă două părți soluție A cu o parte soluție B.

9. **Colorantul Giemsa** (folosit pentru colorarea nucleului): Soluție Giemsa se prepară din:

azur II eozină	3 g
azur II	0,8 g
glicerol	125 g
alcool metilic	375 ml

Se încălzește glicerina la 60°C, se adaugă cei doi coloranți și se agită până la dizolvarea completă. Amestecul se încălzește din nou la 60°C și se adaugă apoi alcoolul metilic, se agită și după 24 ore de

păstrare la temperatura camerei, amestecul se filtrează prin hârtie de filtru.

10. Albastru de toluidină (folosit pentru colorația capsulei):

albastru de toluidină ..... 0,5 g
alcool etilic 96° ..... 10 ml
acid fenic ..... 3 g
apă distilată ..... până la 1.000 ml

11. Coloranți pentru cili:

a) Soluția A - mordant fier - tanin

tanin (soluție apoasă 10%) ..... 18 ml
$FeCl_2.6\ H_2O$ (soluție apoasă 6%) ..... 6 ml
acid fenic ..... 3 g

b) Soluția B - substanță colorantă mordant

soluție A ..... 3,5 ml
fucsină bazică ..... 0,5 ml
HCl conc. ..... 0,5 ml
formalină ..... 2,0 ml

c) Soluție fucsină Ziehl.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. AARONSON, S., 1970 - **Experimental Microbial Ecology**, Acad. Press, New York, London.

2. AILIESEI OCTĂVIŢA, 1992 - **Imunobiologie. Tehnici şi metode de laborator**, Ed. Universităţii "Al.I.Cuza" Iaşi.

3. ALTERAŞ, I., CAJAL, N., COJOCARU, I., COMOROŞAN, S., DĂNCESCU, P., IEREMIA, T., KONDI, V., MITRICĂ, N., 1962 - **Manual de laborator clinic**. Ed. Medicală, Bucureşti.

4. ANGHEL, I., TATIANA VASSU, SEGAL, B., BERZESCU, P., VICTORIA HERLEA, VALENTINA DAN, IOANA ANCEA, KTREIN, I., 1989 - **Biologia şi tehnologia drojdiilor**. vol. 1, Ed. Tehnică, Bucureşti.

5. ANGHEL, I., TATIANA VASSU, SEGAL, B., BERZESCU, P., VICTORIA HERLEA, VALENTINA DAN, IOANA OANCEA, KTREIN, I., 1991 - **Biologia şi tehnologia drojdiilor**, vol. 2, Ed. Tehnică, Bucureşti.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. BÂRZOI, D., 1985 - **Microbiologia produselor alimentare de origine animală**. Ed. Ceres, Bucureşti.

7. **BERGEY'S Manual of Systematic Bactyeriology**. 9th edition, 1989, Williams & Wilkins, Baltimore, Londra.

8. BRISOU, J., 1971 - **Techniques d'enzymologie bactérienne**. Masson et Comp. editeurs, Paris.

9. BUIUC, D., BERNESCU-SĂRĂCĂCEANU ELENA, 1974 - **Ghid pentru lucrările practice de bacteriologie medicală**. Partea I şi II. (litografiat), I.M.F. Iaşi.

10. BURGEOIS, C.M., LEVEAU, J.V., 1993 - **Techniques d'analyse et de controle dans les industries agroalimentaires. Le controle microbiologique**. 2 édition entiérement revue, Paris.

11. CONSTANTINESCU O., 1974 - **Metode şi tehnici în micologie**. Ed. Ceres, Bucureşti.

12. CRABTREE K., HINSDILL, R., 1974 - **Fundamental Experiments in Microbiology**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

13. DAN VALENTINA, IOANA OANCEA, PANĂ, N., CRISTINA KRAMER, TOFAN CLEMENSA, ZARA MARGARETA,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1985 - Îndrumar de lucrări practice de microbiologie. Universitatea Galaţi.

14. DAN VALENTINA, OANCEA IOANA, PANĂ, N., KRAMER CRISTINA, MARGARETA ZARA, CLEMENSA TOFAN, 1985 - Controlul microbiologic al produselor alimentare. Universitatea Galaţi, Facultatea de Industrie Alimentară.

15. DAN VALENTINA, KRAMER CRISTINA, BAHRIM GABRIELA, NICOLAU ANCA, 1995 - Memorator drojdii. Universitatea Galaţi, Facultatea de Industrie Alimentară şi Acvacultură.

16. DOMMERGUES, Y., MANGENOT, F., 1970 - Écologie microbienne du sol. Ed. Manson, Paris.

17. DRAPEAU, A.J., JANKORIC, S., 1977 - Manuel de microbiologie de l'environnement. O.M.S., Geneva.

18. DUNĂREANU, H., LUPAŞCU, GH. ERNEST, 1970 - Investigaţia bacteriologică în clinică. Ed. Medicală, Bucureşti.

19. FRAUZBLAU, S.G., HINNEBUSCH, B.J., KELLEY, L.M., SINCLAIR, N.A., 1984 - Effect of non coliforms on coliform detection in potable groundwater. Appl. Environ. Microbiol, 48, 1, 142-148.

BCU IAŞI

20. FROBISHER, M., HINSDILL, D.R., CRABTREE, T.K., GOODHEART, R.C., 1974 - Fundamentals of Microbiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

21. GESTIN, J.L., GOLDSTEIN, F.W., ACAR, J.F., 1991 - Atlas de bactériologie. Examens directs par coloration usuelles. Université Pierre et Marrie Curie, Paris.

22. GHEŢIE V., MICUŞAN V., 1966 - Analiza imunochimică. Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti.

23. GOERS, J., 1993 - Immunochemical Techniques. Laboratory Manual. Acad. Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers.

24. HULEA ANA, 1969 - Ghid pentru laboratoare de micologie şi bacteriologie. Ed. Agrosilvică, Bucureşti.

25. INGRAM, M., SIMONSEN, B., 1980 - Microbial ecology of foods. vol. II, Acad. Press, London.

26. KONEMAN, W.E., ALLEN, D.S., 1992 - Diagnostic Microbiology. (4th edition), J.B. Lippincott Company, Washington.

27. LASKIN, I.A., LECHEVALIER, A.H., 1973 - Handbook of Microbiology. vol. I. C.R.C. Press, Cleveland.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

28. LUCAS, O.D., MEINKE, W., 1990 - **Zinsser Microbiology. A Study Guide**. Appleton 8 Lange, Norwalk, Connecticus.

29. MĂNESCU, S., 1989 - **Microbiologie sanitară**. Ed. Medicală, Bucureşti.

30. MESROBEANU, I., BERCEANU, ŞT., 1975 - **Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie**.Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti.

31. MEYNELL, G.G., MEYNELL ELINOR, 1970 - **Theory an Practice in Experimental Bacteriology**. The University Press, Cambridge.

32. NESTORESCU, N., 1965 - **Bacteriologie medicală**. Ed. Medicală, Bucureşti.

33. NIMIŢAN ERICA, 1992 - **Biotehnologii microbiene**. Ed. Universităţii "Al.I.Cuza" Iaşi.

34. NIMIŢAN ERICA, ŞT. COMĂNESCU, ELENA MARIN, 1997 - **Ecologia microorganismelor**. Ed. Cermi, Iaşi.

35. PAPACOSTEA, P., 1980 - **Biologia solului**. Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti.

36. PARKINSON, D., GRAY, T.R.G., WILLIAMS, S.T., 1971 - **Methods for Studying the Ecology of Soil Microorganisms**.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I.B.P., Handbook 19.

37. PIPES, W.O., CHRISTIAN, R.R., 1984 - Estimating mean coliform densities of water distribution systems. J. Am. Water Works Assoc., 76, 11, 60-64.

38. POCHON, J., TARDIEUX, P., 1954 - Manuel techniques d'analyse microbiologique des sols. Paris.

39. POCHON, J., TARDIEUX, P., 1958 - Traité de microbiologie de sols. Paris.

40. RĂDUCĂNESCU, H., BICA-POPII VALERIA, 1973 - Bacteriologie veterinară aplicată. Ed. Ceres, București.

41. REVILLARD, J.P., 1994 - Immunologie. De Boeck Wesmael S.A., Bruxelles.

42. TOPALĂ, N.D., 1978 - Microbiolgie generală. vol. I și II. (curs litografiat), Universitatea "Al.I.Cuza" Iași.

43. SCRIBAN, R., 1993 - Biotechnologie. 4 edition. Technique Domentation. Lavoisier, Paris, Londra, New-York.

44. ZARNEA, G., 1983 - Tratat de microbiologie generală - vol. I, Ed. Acad. R.S.R., București.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

45. ZARNEA, G., 1984 - **Tratat de microbiologie generală** - vol. II, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti.

46. ZARNEA, G., 1990 - **Tratat de microbiologie generală** - vol. IV, Ed. Acad. Române, Bucureşti.

45. ZARNEA, G., 1994 - **Tratat de microbiologie generală** - vol. V, Ed. Acad. Române, Bucureşti.

46. ZARNEA, G., MIHĂESCU, GR., VIORICA VELEHORSCHI, 1992 - **Principii şi tehnici de microbiologie generală** - vol. I, Ed. Universităţii Bucureşti.

47. * * * - **Difco Manual**, Ed. IX, Detroit, 1971.

48. * * * - **The Oxoid Manual of culture media**, 3th edition, Oxoid Ltd, London, 1967.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE 4

1. ORGANIZAREA ŞI DOTAREA LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE 5
1.1. AMENAJAREA LABORATORULUI 5
1.2. DOTAREA LABORATORULUI ŞI PREGĂTIREA MATERIALELOR 6
1.3. MĂSURI SPECIFICE DE PROTECŢIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE 13

2. STERILIZAREA 15
2.1. STERILIZAREA PRIN AGENŢI FIZICI 16
2.1.1. Metode de sterilizare prin căldură uscată 16
2.1.2. Metode de sterilizare prin căldură umedă 19
2.1.3. Filtrarea 26
2.1.4. Sterilizarea cu raze ultraviolete 31
2.1.5. Sterilizarea cu ultrasunete 31
2.2. STERILIZAREA PRIN AGENŢI CHIMICI . . . 32

3. MEDIILE DE CULTURĂ 35
3.1. DEFINIŢIE, CONDIŢII, CLASIFICARE 35
3.2. CLASIFICAREA MEDIILOR DE CULTURĂ . 36
3.3. PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ . . . 39
3.3.1. Prepararea mediilor simple 39
3.3.2. Prepararea mediilor complexe 43
3.3.3. Prepararea mediilor speciale 44
3.3.3.1. Medii de îmbogăţire 44
3.3.3.2. Medii selective 46
3.3.3.3. Medii elective 49
3.3.3.4. Medii diferenţiale 51
3.3.3.5. Medii de conservare 52
3.3.4. Determinarea reacţiei (pH) mediilor de cultură 53

4. ÎNSĂMÂNŢAREA MEDIILOR DE CULTURĂ. CULTURI ŞI COLONII MICROBIENE. OBŢINEREA CULTURILOR PURE 63
4.1. TEHNICI DE ÎNSĂMÂNŢARE 63

BCU INGINERIE LIBRARY

4.2. OBȚINEREA CULTURILOR PURE 69
4.2.1. Izolarea pe medii solide 71
4.2.2. Izolarea prin însămânțare pe medii speciale 73
4.2.3. Izolarea bazată pe particularitățile de comportare a bacteriilor față de agenții fizici, chimici și biologici 74
4.2.4. Izolarea prin metode biologice 75
4.3. CULTURILE ȘI COLONIILE MICROBIENE . 76

5. TEHNICA EXAMINĂRII CARACTERELOR MORFOLOGICE ȘI TINCTORIALE ALE BACTERIILOR 80
5.1. EXAMENUL MICROSCOPIC 80
5.1.1. Examenul bacteriilor în stare vie 81
5.1.2. Examenul bacteriilor în frotiuri colorate . 82
5.2. METODE DE COLORARE 85
5.2.1. Colorația simplă 85
5.2.2. Colorații compuse 86
5.2.3. Colorații speciale 90
5.2.3.1. Colorarea sporilor bacterieni . . 90
5.2.3.2. Colorarea capsulei 92
5.2.3.3. Colorarea cililor bacterieni . . . 93
3.2.3.4. Colorarea peretelui celular . . . 96
5.2.3.5. Colorarea nucleului 97
5.2.3.6. Colorarea incluziunilor citoplasmatice 98

6. METODE DE MICROSCOPIE UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIE 99
6.1. MICROSCOPUL FOTONIC CU FOND CLAR 100
6.2. MICROSCOPUL CU FOND NEGRU (cu câmp întunecat) 113
6.3. MICROSCOPUL CU RAZE ULTRAVIOLETE 116
6.4. MICROSCOPUL CU CONTRAST DE FAZĂ . 123
6.5. MICROSCOPUL ELECTRONIC 131
6.6. MICROSCOPIA ELECRONICĂ CU BALEIAJ (SCANNING) 138

BCU IAȘI

7. MORFOLOGIA ŞI DIMENSIUNILE BACTERIILOR 143
7.1. MORFOLOGIA BACTERIILOR 143
7.2. DIMENSIUNILE BACTERIILOR 152

8. STUDIUL PROPRIETĂŢILOR FIZIOLOGICE ŞI BIOCHIMICE ALE BACTERIILOR 155
8.1. PROPRIETĂŢILE FIZIOLOGICE 155
8.1.1. Mobilitatea bacteriilor 155
8.1.2. Metode de cultivare a bacteriilor în anaerobioză 157
8.2. PROPRIETĂŢILE BIOCHIMICE ALE BACTERIILOR 162
8.2.1. Evidenţierea capacităţii de utilizare a glucidelor 163
8.2.1.1. Examinarea proprietăţilor zaharolitice în apă peptonată cu albastru bromtimol 165
8.2.1.2. Testul de hidroliză a amidonului 166
8.2.2. Evidenţierea proprietăţilor proteolitice . 167
8.2.2.1. Testul de hidroliză a cazeinei 167
8.2.2.2. Testul de gelatinoliză 168
8.2.2.3. Testul de lichefiere a serului coagulat 168
8.2.2.4. Testul de hemoliză 169
8.2.3. Evidenţierea produşilor rezultaţi din descompunerea aminoacizilor 170
8.2.3.1. Evidenţierea producerii de hidrogen sulfurat 170
8.2.3.2. Punerea în evidenţă a indolului 171
8.2.4. Testul de hidroliză a ureei 172
8.2.5. Evidenţierea proprietăţilor reducătoare ale bacteriilor 174
8.2.5.1. Reacţia de reducere a nitraţilor în nitriţi (testul de denitrificare) 174
8.2.5.2. Reacţia Voges-Proskauer (reacţia acetil-metil-carbinol) 175
8.2.5.3. Reacţia roşu de metil 176
8.2.5.4. Evidenţierea catalazei 177
8.2.6. Proprietăţile lipolitice ale bacteriilor 178

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8.2.6.1. Evidențierea activității lipolitice pe mediul cu tributirină 178
8.2.6.2. Evidențierea activității lipolitice în plăci cu geloză cu ulei steril 179
8.2.7. Testul cultivării bacteriilor în lapte turnesolat 179
8.2.8. Alte teste biochimice 181
8.2.8.1. Dezvoltarea pe mediu cu manitol 181
8.2.8.2. Dezvoltarea pe agar hiperclorurat 181
8.2.8.3. Folosirea de către bacterii a sărurilor de amoniu ca unică sursă de azot 182

9. IDENTIFICAREA ȘI CLASIFICAREA UNEI BACTERII NECUNOSCUTE 183

10. ALTE GRUPE DE BACTERII 185
10.1. ACTINOMICETELE 185
10.2. CYANOBACTERIILE (algele albastre-verzi) . 194

11. LEVURILE 197
11.1. METODE ȘI TEHNICI DE STUDIU A LEVURILOR 207
11.2. TEHNICI DE APRECIERE A ACTIVITĂȚII METABOLICE A LEVURILOR 211
11.3. METODE DE DETERMINARE A PUTERII FERMENTATIVE A LEVURILOR 213

12. MUCEGAIURILE 217

13. METODE FOLOSITE ÎN STUDIUL FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE 229
13.1. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII LA BACTERIOFAGI A UNEI TULPINI BACTERIENE 231
13.2. IZOLAREA BACTERIOFAGILOR 232
13.2.1. Metoda directă de izolare 233
13.2.2. Metoda prin multiplicare 235
13.3. TITRAREA BACTERIOFAGILOR 236

BCU IAȘI

13.4. APLICAȚIILE PRACTICE ALE FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE 237

14. STUDIUL PRINCIPALILOR FACTORI CARE CONDIȚIONEAZĂ STAREA DE IMUNITATE .. 239
14.1. FACTORII CELULARI AI IMUNITĂȚII (IMUNITATEA CELULARĂ) 240
14.1.1. Principalele tipuri de celule cu proprietăți fagocitoare 240
14.1.2. Studiul fenomenului de fagocitoză ... 245
14.1.3. Determinarea indicelui opsono-citofagic, ca interrelație între procesele celulare și cele umorale de imunitate 247
14.2. REACȚIILE DINTRE ANTIGEN ȘI ANTICORP (REACȚII SEROLOGICE) 250
14.2.1. Reacția de aglutinare (seroaglutinare) 252
14.2.1.1. Reacția de aglutinare în tuburi (reacție cantitativă) 252
14.2.1.2. Reacția de aglutinare pe lamă 256
14.2.2. Reacția de precipitare (seroprecipitarea) 257
14.2.2.1. Precipitarea în mediu lichid . 258
14.2.2.2. Reacția de precipitare în gel (imunodifuzia) 260
14.2.2.3. Aplicații ale reacției de precipitare 262
14.2.3. Reacția de hemoliză 264

15. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE 267
15.1. METODA DIFUZIMETRICĂ 268
15.2. METODA DILUȚIILOR SERIATE (DETERMINAREA C.M.I.) 271

16. DETERMINAREA NUMĂRULUI DE MICROORGANISME DIN DIFERITE MEDII NATURALE 273
16.1. MICROBIOTA SOLULUI 277
16.1.1. Determinarea microflorei din sol 277

BCU IAȘI

16.1.2. Determinarea activităţii biologice globale a solului pe baza CO_2 produs (Determinarea respiraţiei solului) 277
16.1.3. Evidenţierea efectului de rizosferă . . . 280
16.1.4. Determinarea activităţii enzimatice a solului 285
16.1.4.1. Determinarea activităţii catalazice 285
16.1.4.2. Determinarea activităţii dehidrogenazice a solului 287
16.1.4.3. Determinarea activităţii fosfatazice 291
16.2. MICROBIOTA APEI 295
16.2.1. Metodele de analiză curentă 298
16.2.2. Metodele de analiză complementară . . 310
16.3. EXAMINAREA MICROBIOLOGICĂ A AERULUI 323
16.3.1. Metode de sedimentare 324
16.3. METODE ASPIRATIVE 326
16.4. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI ŞI A PRODUSELOR LACTATE 328
16.3.1. Determinarea numărului total de germeni 330
16.3.2. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme 332
16.3.3. Determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri 335
16.3.4. Determinarea încărcăturii laptelui în bacterii sporulate (proba Weinzirl) 337
16.3.5. Proba reductazei 338

17. STUDIUL PRINCIPALELOR GRUPE ECOLOGICE DE MICROORGANISME CARE PARTICIPĂ LA CIRCUITUL ELEMENTELOR BIOGENE ÎN NATURĂ 341
17.1. CIRCUITUL AZOTULUI 341
17.1.1. Fixarea azotului atmosferic 342
17.1.1.1. Microorganisme libere fixatoare de azot 343
17.1.1.2. Bacteriile simbiotice fixatoare de azot atmosferic 350
17.1.2. Proteoliza 352
17.1.3. Amonificarea 354

BCU IASI/C

17.1.4. Nitrificarea 357
17.1.5. Denitrificarea 359
17.2. CIRCUITUL CARBONULUI 361
17.2.1. Celulozoliza 361
17.2.2. Amiloliza 364
17.2.3. Pectinoliza 366
17.3. CIRCUITUL SULFULUI 368
17.3.1. Mineralizarea sulfului organic 369
17.3.2. Oxidarea compuşilor minerali ai sulfului (sulfoxidarea) 370
17.3.3. Reducerea compuşilor minerali oxidaţi ai sulfului (sulfatreducerea) 375

ANEXA. PREPARAREA COLORANŢILOR ŞI REACTIVILOR 378

BIBLIOGRAFIE 382

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tiparul executat la
Centrul de multiplicare al
Editurii Universităţii «Al. I. Cuza»

STR. PĂCURARI NR. 9, IAŞI - 6600

Format: 61x86/16
Coli tipo: 24,75
Apărut: 1998
Comanda: 187

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREȚ: 22.500 lei

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY